



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

CARACTERIZACIÓN DE LA SÍNTESIS DE  $\beta$ -ALANINA EN LOS  
*RHIZOBIALES*.

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
MARIANA LÓPEZ SÁMANO

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ALEJANDRO GARCÍA DE LOS SANTOS  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

COMITÉ TUTOR:  
DRA. ISABEL LOPEZ LARA  
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS  
DRA. ROSA MARÍA GUTIERREZ RÍOS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Cuernavaca, Morelos.

Marzo 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se desarrolló en el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en el Programa de Ingeniería Genómica sede como parte de los estudios del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas en el Programa de Ingeniería Genómica, bajo la dirección del Dr. Alejandro García de los Santos.

Durante la realización de este trabajo se contó con diferentes apoyos económicos. Empezando con el apoyo de manutención del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología, del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-UNAM IN209815 y del Programa de Apoyo para estudios de Posgrado.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro García por el apoyo en la formación doctoral, por su tiempo y sus consejos.

Al Dr. David Romero y a la Dra. Susana Brown por su gran apoyo a lo largo del doctorado, por sus consejos y el tiempo que dedicaron a mi formación.

Al Dr. Michael F. Dunn por su tiempo y asesorías a lo largo del doctorado.

A la M. en C. Laura Cervantes

A la M. en C. Araceli Dávalos por todo su apoyo técnico a lo largo del doctorado, su paciencia y consejos.

A la Dra. Carmen Guadarrama por sus consejos, su tiempo y apoyo técnico.

M. en C. Sofía Absalón por su apoyo técnico y sus consejos.

Al Dr. Víctor Antonio Becerra Rivera por su tiempo y apoyo técnico.

Al Laboratorio 1 de Ingeniería Genómica por todo su apoyo, su tiempo y consejos a lo largo de mi estancia.

Al Dr. Antonio González Sánchez por todo su amor y su apoyo, la paciencia y los consejos; por no dejarme caer y estar siempre para mí de manera incondicional.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida otorgada.

A mi familia

A mis Madres, Tomasa, Roció y Angélica por toda su dedicación, su apoyo, su amor y sus consejos; son las mujeres que formaron mi vida.

A mis Padres, José Luis y Jorge por el ejemplo de vida, por estar ahí de manera incondicional para mí; por toda su dedicación en la formación de mi persona.

A mis hermanos Joseline, Ángel y Jorge, Por su cariño, apoyo y comprensión en los momentos difíciles.

---

## Abstract

$\beta$ -alanine synthesis in bacteria occurs by the decarboxylation of L-aspartate as part of the pantothenate synthesis pathway. In the other two domains of life we find different pathways for  $\beta$ -alanine formation, such as sources from spermine in plants, uracil in yeast and by transamination reactions in insects and mammals. There are also promiscuous decarboxylases that can decarboxylate aspartate. Several bioinformatics studies about the conservation of pantothenate synthesis pathway performed on bacteria, archaea and eukaryotes have shown a partial conservation of the pathway. As a part of our work, we performed an analysis of the prevalence of reported  $\beta$ -alanine synthesis pathways in 204 genomes of  $\alpha$ -proteobacteria, with a focus on the *Rhizobiales* order. The aim of this work was to determine the enzyme or pathway used to synthesize  $\beta$ -alanine in *Rhizobium etli* CFN42. Our bioinformatics analysis showed that this strain encodes the pyrimidine degradation pathway in its genome. We obtained a  $\beta$ -alanine synthase (*amaB*) mutant that was a  $\beta$ -alanine auxotroph. Complementation with the cloned gene restored the wild type phenotype. Biochemical analysis confirmed that the recombinant AmaB catalyzed the formation of  $\beta$ -alanine from 3-Ureidopropionic acid *in vitro*. Here we show a different way in bacteria to produce this essential metabolite.

## Importance

Since the pioneer studies of Cronan (1980) on  $\beta$ -alanine synthesis in *E. coli*, it has been assumed that the decarboxylation of aspartate by the L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase it's the main enzymatic reaction for  $\beta$ -alanine synthesis in bacteria. Forty years later, while we were studying the pantothenic acid synthesis in rhizobia, we demonstrate that a numerous and diverse group of bacteria classified as  $\alpha$ -proteobacteria synthesize  $\beta$ -alanine *de novo* using  $\beta$ -alanine synthase, the last enzyme from the reductive pathway for uracil degradation. Additionally, there is

a growing interest in  $\beta$ -amino acid due to its remarkable pharmaceuticals properties as hypoglycemic, antiketogenic and anti-fungal agents.

## Acknowledgments

Mariana López-Sámano is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 295956 from CONACYT. We are grateful to Susana Brom and Michael F. Dunn for their helpful discussion and for critically reviewing the manuscript. We gratefully acknowledge Laura Cervantes and Victor Antonio Becerra Rivera for their skillful technical assistance. This research was supported by the annual institutional budget that *UNAM* shares with scientists.

## RESUMEN

A través de los años, se ha establecido que la síntesis de  $\beta$ -alanina en bacterias se lleva a cabo mediante la descarboxilación de L-aspartato (Asp), como parte de la vía de síntesis de ácido pantoténico. Dentro de los diferentes dominios de vida podemos encontrar vías metabólicas alternas para la síntesis de  $\beta$ -alanina, a partir de sustratos como: espermidina en plantas y algunas levaduras; degradación de uracilo en levaduras y moscas, además de algunas transaminasas reportadas en insectos y mamíferos. Así mismo, podemos encontrar enzimas descarboxilasas promiscuas que pueden actuar como aspartato descarboxilasas (ADC) y usar Asp como sustrato. Se han realizado varios estudios bio-informáticos acerca de la conservación de la vía de síntesis de pantotenato dentro de bacterias, arqueas y eucariontes, mostrando una conservación parcial de la vía y al menos una enzima faltante. Como parte de nuestro trabajo, se realizó un análisis de co-ocurrencia de las diferentes vías de síntesis de  $\beta$ -alanina reportadas en los distintos dominios de vida, dentro de 204 genomas de alfa proteobacterias, concentrándonos en el orden *Rhizobiales*. El objetivo de este trabajo fue, elucidar la vía de síntesis de  $\beta$ -alanina en *Rhizobium etli* CFN42. El análisis bio-informático mostró la

conservación de la vía de degradación de uracilo dentro del genoma de *Rhizobium*. Obtuvimos una mutante en el *gen amaB* con fenotipo de auxotrofia a  $\beta$ -alanina. Por lo que, se midió la actividad de la enzima recombinante in vitro mediante HPLC para confirmar la actividad catalítica de esta proteína; la cual forma  $\beta$ -alanina a partir de ácido 3-ureidopropiónico. En este trabajo, se demostró el uso de una vía alterna y diferente a la establecida para producir este metabolito esencial.

### Importancia

A partir de los estudios de Cronan acerca de la biosíntesis de  $\beta$ -alanina en *E. coli*, se ha asumido que la descarboxilación de L-aspartato por la enzima L-aspartato- $\alpha$ -descarboxilasa es la principal vía de síntesis de  $\beta$ -alanina en bacterias. Cuarenta años después, mientras estudiábamos la vía de síntesis de pantotenato en *rhizobia*, demostramos que un grupo numeroso y diverso de bacterias clasificadas como  $\alpha$ -proteobacterias sintetizan  $\beta$ -alanina *de novo* usando  $\beta$ -alanina sintasa, la última enzima de la vía reductora para la degradación del uracilo. Además, existe un interés creciente en los  $\beta$ -aminoácidos debido a sus notables propiedades farmacéuticas como agentes hipoglucemiantes, anticetogénicos y antifúngicos.

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Aminoácidos: Estructura, clasificación y función; esenciales y no esenciales.	1
Aminoácidos proteinogénicos	2
Aminoácidos no proteinogénicos	3
La $\beta$ -alanina como molécula en los diferentes dominios.	4
Síntesis de $\beta$ -alanina en procariontes, E. coli y otras $\gamma$ -proteobacterias.	5
Síntesis de $\beta$ -alanina en arqueas	6
Síntesis de $\beta$ -alanina en Eucariontes (Levaduras, Plantas y Mamíferos)	7
Biosíntesis del ácido pantoténico (vitamina B5)	9
Síntesis de Coenzima A	12
Vía reductiva de la degradación de uracilo.	14
$\beta$ -alanina sintasa como enzima de estudio, características y potencial biotecnológico.	15
<i>Descripción de los rhizobios.</i>	<b>16</b>
<i>Generalidades de Rhizobium etli CFN42.</i>	<b>17</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>19</b>
Identificación del gen <i>amaB</i> que codifica para una $\beta$ -alanina sintasa que produce la auxotrofia de este aminoácido en <i>R. etli</i> CFN42.	24
<i>Hipótesis</i>	<b>24</b>
<i>Objetivos:</i>	<b>24</b>
<i>Resultados</i>	<b>25</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>26</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>28</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>29</b>
<i>Anexos</i>	<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>32</b>



## INTRODUCCIÓN

---

Aminoácidos: Estructura, clasificación y función; esenciales y no esenciales.

Un amino ácido esta conformado estructuralmente por un grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ), un grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ), una cadena variable o lateral ( $-\text{R}$ ) y un átomo de hidrogeno ( $\text{H}$ ). Estos grupos se unen a un esqueleto de carbono ocupando sus cuatro enlaces disponibles, haciendo de este un carbono alfa ( $\text{C}_\alpha$ ) con una estructura tetraédrica (Fig. 1). La identidad de un aminoácido se define por la especificidad de la cadena variable unida al esqueleto de carbono.

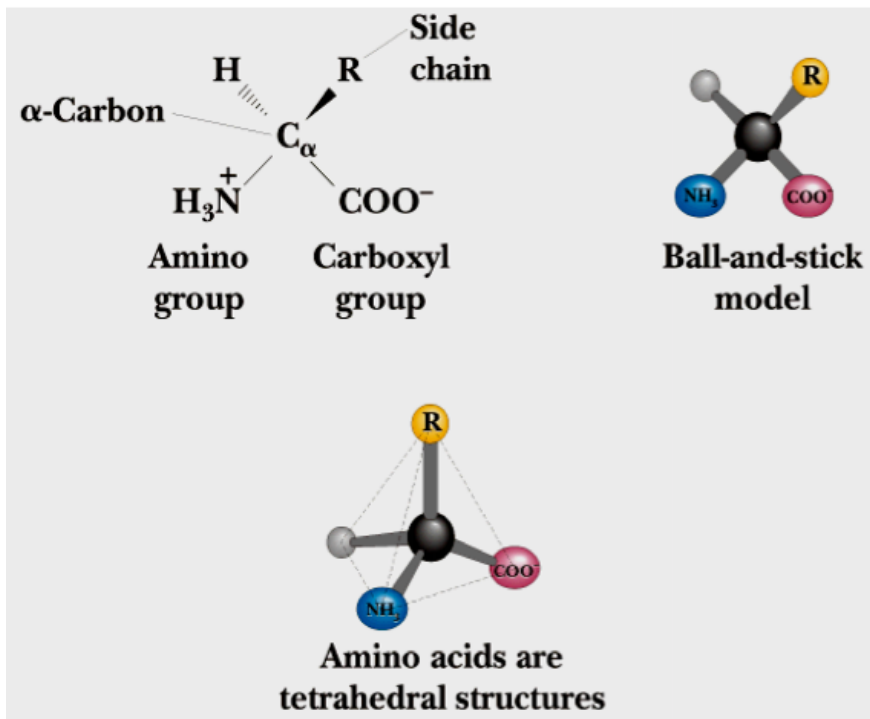


Fig. 1 Componentes estructurales de un aminoácido. (Garrett and Grisham. *Biochemistry*. 4a ed. 2009)

El aminoácido es la unidad fundamental que compone las proteínas, estas se forman de una o varias cadenas polipeptídicas, dando lugar a diferentes tamaños de proteínas que se organizan en diferentes niveles de complejidad para llevar a cabo funciones específicas. Todos los aminoácidos que conforman las proteínas tienen configuración L- $\alpha$ , esto hace referencia a la isometría óptica que presenta

un carbono- $\alpha$ . Dependiendo de la disposición de sus grupos en el espacio tienen dos conformaciones posibles: una L (Levo, izquierda) y otra D (Dextro, derecha), también llamados enantiómeros. Si el grupo amino está a la izquierda sería **L**, y si el grupo amino está a la derecha, sería **D** (fig. 2).

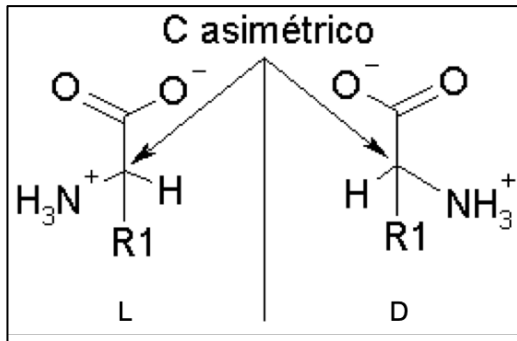


Fig. 2 Configuración L y D de un carbono alfa. Cuando el grupo amino del aminoácido está posicionado a la izquierda se le denomina L y, cuando se encuentra a la derecha, D.

### Aminoácidos proteínogénicos

Se les conoce así a los aminoácidos que conforman las proteínas codificados en el ADN en la mayoría de los seres vivos; de estos 20 aminoácidos, 8 son esenciales (valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, lisina, treonina y triptófano). Se les conoce como esenciales ya que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y se obtienen a través de la ingesta de alimentos. Una deficiencia de incluso un aminoácido resulta en un balance negativo de nitrógeno. En este estado, se degrada más proteína de la que se sintetiza, por lo que se excreta más nitrógeno del que se ingiere.

Además de esta función, también participan como precursores de diferentes sustancias biológicas, como las hormonas, los neurotransmisores o incluso los pigmentos de la piel. Además, existen selenocisteína y pirrolisina en arqueobacterias. En bacterias modelo como *E. coli*, se conocen las vías metabólicas que utiliza para sintetizar los 20 aminoácidos proteínogénicos.

## Aminoácidos no proteinogénicos

Se conoce una gran variedad de estos aminoácidos principalmente en plantas, a pesar de que estos no forman parte de las proteínas; poseen diferentes funciones tanto en el cuerpo humano como en la naturaleza, entre ellas destacan las coenzimas, toxinas, neurotransmisores, etc.

Los aminoácidos no esenciales se sintetizan mediante reacciones bastante simples, mientras que las vías para la formación de los aminoácidos esenciales son bastante complejas. Por ejemplo, los aminoácidos no esenciales alanina y aspartato se sintetizan en un solo paso a partir de piruvato y oxaloacetato, respectivamente. En contraste, las vías para los aminoácidos esenciales requieren de 5 a 16 pasos. La única excepción a este patrón es la arginina, ya que la síntesis de este aminoácido no esencial de novo requiere 10 pasos. Sin embargo, típicamente, se realiza en solo 3 pasos a partir de ornitina como parte del ciclo de la urea. La tirosina, clasificada como un aminoácido no esencial porque puede sintetizarse en 1 paso a partir de fenilalanina, requiere 10 pasos para sintetizarse desde cero y es esencial si la fenilalanina no es abundante. Estos aminoácidos pueden clasificarse en tres categorías dada su estructura:

Los D-aminoácidos: D-Ala y D-Glu, los cuales forman parte de la pared celular de peptidoglicano en bacterias. D-Phe que forma parte de un péptido con acción antibiótica. En algunos anfibios y reptiles también se han encontrado péptidos con D-aa.

Los  $\alpha$ -aminoácidos: L-Ornitina y L-Citrulina que funcionan como intermediarios en el metabolismo de nitrógeno y creatinina. Además se ha observado recientemente el uso de la L-Ornitina en la formación de lípidos de membrana en bacterias gram negativas. (reff) A este mismo grupo pertenecen la homoserina y homocisteína.

Los  $\omega$ -aminoácidos: en estos aminoácidos la peculiaridad es que el grupo amino se encuentra sustituyendo el último carbono de la estructura y no, unido al carbono- $\alpha$ . Un ejemplo de estos es la B-Ala, la cual tiene un papel importante como sustrato de la coenzima A, la cual es clave para el funcionamiento en el metabolismo central de cualquier célula. Otro ejemplo de estos aminoácidos es, el ácido gamma amino butírico, el cual desempeña un papel fundamental como neurotransmisor en eucariontes mayores. .

La  $\beta$ -alanina como molécula en los diferentes dominios.

La importancia de los beta aminoácidos se ha estudiado ampliamente debido a su uso en la producción de  $\beta$ -péptidos y compuestos farmacológicos de interés comercial (Martínez-Rodríguez, Martínez-Gómez, Rodríguez-Vico, Clemente-Jiménez, & Las Heras-Vázquez, 2010). La  $\beta$ -alanina es un  $\beta$ -aminoácido natural no proteinogenico, se diferencia de su isómero L-alanina debido a su configuración en la cual el grupo amino se encuentra en el carbono beta y no en el alfa como en los aminoácidos esenciales (Fig. 3). Filogenéticamente es una molécula ampliamente distribuida a lo largo de los tres dominios de la vida. Esta funciona como precursor de la coenzima A y el ácido pantoténico (vitamina B5) en bacterias y hongos (Cronan, Littel, & Jackowski, 1982); en los eucariontes cumple con funciones mayores. Se encuentra ampliamente distribuida lo largo del sistema nervioso central en vertebrados y a su vez actúa como análogo estructural del ácido gamma amino butírico (GABA) y la glicina, dos inhibidores de neurotransmisores (Lundgren, Gojković, Piškur, & Dobritsch, 2003). También podemos encontrar la  $\beta$ -alanina como componente estructural de las moléculas de carnosina y anserina, las cuales se concentran en tejido muscular y cerebral en mamíferos (Henley, n.d.).

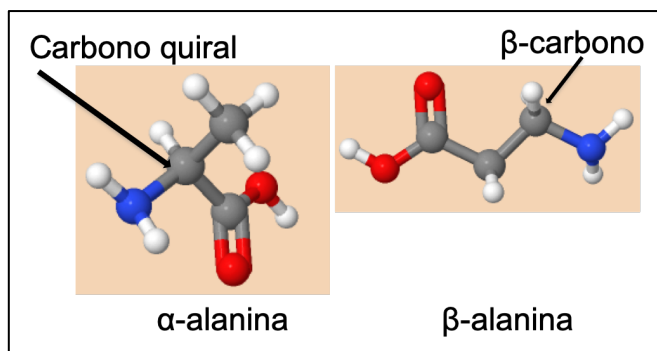


Fig. 3.- Configuración de las moléculas de  $\alpha$ -L-alanina y  $\beta$ -alanina.

---

Síntesis de  $\beta$ -alanina en procariontes, *E. coli* y otras  $\gamma$ -proteobacterias.

La síntesis de  $\beta$ -alanina en bacterias no ha sido completamente elucidada, para *E. coli* y otras  $\gamma$ -proteobacteria se ha establecido que se produce a partir de la descarboxilación de L-aspartato a través de la enzima 1-L-aspartato descarboxilasa (ADC), la cual utiliza un motivo piruvil y es producto del gen *panD*. Esta enzima se escinde proteolíticamente en el enlace Gly<sup>24</sup>-Ser<sup>25</sup> (Ramjee, Genschel, Abell, & Smith, 1997), para producir una subunidad  $\beta$ - con un OH en su extremo C-terminal y una subunidad  $\alpha$ - con un grupo piruvil en su extremo N-terminal, derivado de la serina para ser funcional. De la reacción enzimática a partir de L-aspartato se produce CO<sub>2</sub> y  $\beta$ -alanina.

Los primeros estudios en la ADC de *E. coli* (Williamson & Brown, 1979) definieron el peso molecular en 58 kDa y en ello se establece la unión covalente con un motivo piruvil al tetrámero asociado por las unidades  $\alpha$  y  $\beta$  de esta molécula. El piruvato está involucrado en la catálisis y la formación de una base schiff entre la enzima y el sustrato dentro del sitio activo localizado entre las unidades adyacentes. La enzima se traslada como una proteína inactiva y posteriormente se re-arregla intracelularmente para adquirir su forma activa. Dentro del análisis realizado por Cronan, se demostró que al realizar una mutación en este gen dentro del genoma de *E. coli*, la mutante se vuelve auxótrofa de  $\beta$ -alanina; tiene un déficit

de crecimiento en medio mínimo, el cual se restaura al adicionar  $\beta$ -alanina o pantotenato al medio de cultivo (Cronan Jr, 1980).

Dentro de los procariontes, las enterobacterias son las más ampliamente estudiadas en la síntesis de  $\beta$ -alanina. Recientemente se encontró que en algunas y proteo-bacterias la enzima acetil-transferasa actúa como madurador de la apoenzima ADC, a quien denominaron panM/panZ (factor de regulación *panD*) fig. 4; el cual ayuda a escindir a la proteína y dar lugar a su forma activa. Así mismo, se le atribuye la función de regulador negativo en la producción de esta molécula (Monteiro et al., 2015).

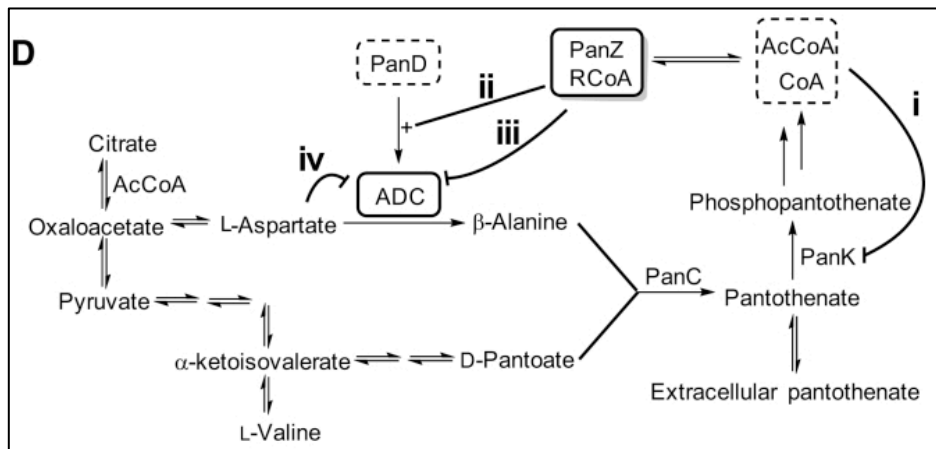


Fig. 4.- Modelo propuesto para la regulación global de pantotenato y coenzima A en *E. coli* (Leonardi & Jackowski, 2007).

A pesar de que se ha establecido que la descarboxilación es la única reacción que se da en bacterias para la síntesis de  $\beta$ -alanina, recientemente se encontró la enzima Act, que es una  $\beta$ -alanina-CoA transferasa, la cual recicla CoA a partir de uno de sus tioésteres y de esta manera genera  $\beta$ -alanina; esta reacción solo se ha descrito en *Clostridium propionicum* (Herrmann et al., 2005).

Síntesis de  $\beta$ -alanina en arqueas

La síntesis de *nov*o de  $\beta$ -alanina en arqueas sigue siendo a través de la descarboxilación, mediante la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) descubierta recientemente por Tomita y colaboradores (Tomita, Yokooji, Ishibashi, Imanaka, & Atomia, 2014). En este trabajo se enfocó en encontrar los genes ortólogos de *E. coli* en el genoma de *Thermococcus kodakarencis involucrados con la síntesis de pantotenato*. Al analizar la expresión de las enzimas candidatas encontradas en el genoma de *T. kodakarencis*, revelo que la encargada de descarboxilar L-aspartate es una descarboxilasa de glutamato; debido a la analogía estructural de los dos aminoácidos.

Mediante la expresión de la enzima GAD de *T. kodakarencis* en una mutante panD de *E. coli*, comprobaron la actividad de la enzima GAD para descarboxilar L-aspartato con mayor afinidad que glutamato. A diferencia de las enzimas ADC, la enzima GAD utiliza un cofactor piridoxal 5-phosphate (PLP). La reacción enzimática de la enzima GAD de manera correcta descarboxila glutamato y produce GABA (Tomita et al., 2014).

#### Síntesis de $\beta$ -alanina en Eucariontes (Levaduras, Plantas y Mamíferos)

A diferencia de los procariontes, en donde la síntesis de  $\beta$ -alanina se lleva a cabo mediante un solo paso enzimático; en Eucariontes se puede dar a través de varias enzimas o vías metabólicas (Fig. 5). En levaduras por ejemplo, se encuentran diferentes vías para la síntesis de *nov*o de  $\beta$ -alanina; en organismos como *Saccharomyces cerevisiae* está demostrado que se produce a partir de la degradación de poliaminas, como son espermidina y espermina (White, Gunyuzlu, & Toyn, 2001); y esta reacción es dependiente de la amino oxidasa FEMS1. Sin embargo, algunas otras levaduras como *S. Pombe* y *S. Kluyveri* se describió la utilización de la vía de degradación de uracilo para la formación de  $\beta$ -alanina (Lundgren et al., 2003; Stolz, Caspari, Carr, & Sauer, 2004). Esta vía degrada uracilo mediante tres reacciones enzimáticas, obteniendo como productos finales CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> y  $\beta$ -alanina (Schnackerz & Dobritzsch, 2008). En los hongos dada la ausencia de homólogos de la enzima ADC o las enzimas para la degradación de

poliaminas, se asume que la obtención de  $\beta$ -alanina es a través del consumo exógeno de pantotenato por medio de una permeasa de aminoácidos denominada Gap1p (Stolz & Sauer, 1999).

Al igual que otros eucariontes, las plantas poseen métodos alternativos mediante los cuales se produce la  $\beta$ -alanina. Se ha demostrado la síntesis a partir de la degradación de poliaminas y la utilización de la vía de degradación de uracilo (Duhazé, Gagneul, Leport, Larher, & Bouchereau, 2003; Katahira & Ashihara, 2006), así como el uso una  $\beta$ -alanina aminotransferasa, la cual funciona a partir de oxopropanoato en *Arabidopsis thaliana* (Liepman & Olsen, 2001), (Fig 5). En eucariontes mayores como son los mamíferos, se han encontrado transaminasas que producen  $\beta$ -aminoácidos a partir de diferentes sustratos (Dalluge, Liao, Gokarn, & Jessen, 2005).

De acuerdo con White se conocen 6 posibles genes/vías para la producción de  $\beta$ -alanina en los diferentes dominios de vida; retomando la figura descrita por White y colaboradores (Wang, Xu, & White, 2014), se diseñó la siguiente figura.



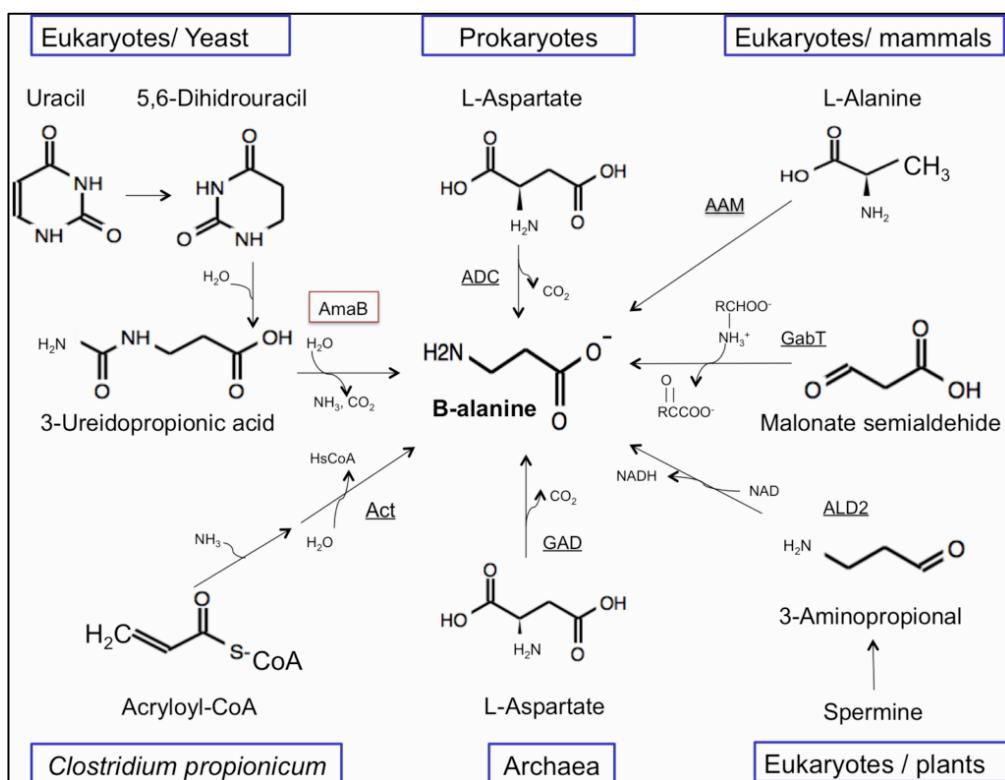


Fig. 5.- Diferentes reacciones para formar b-alanina en los diferentes dominios de vida. **A)** Vía de degradación de uracilo (Duhazé et al., 2003; Lundgren et al., 2003); **B)** descarboxilación de L-aspartato por la enzima ADC (Cronan et al., 1982); **C)** reacción de la 2,3-aminomutasa sobre la b-alanina (Dalluge et al., 2005; Yun, Lim, Cho, & Kim, 2004); transaminación de malonato semialdehído por la enzima Gabt (Nanaya, Hidenori, Keiko, tatsuhiko, Ikeda, & Takao, 1982; Wilding, Peat, Newman, & Scott, 2016); **D)** vía de degradacion de poliaminas hacia espermina por la enzima amino oxidase (White et al., 2001); **E)** descarboxilación de L-aspartato por la glutamato descarboxilasa GAD (Tomita et al., 2014); **F)** Adición de amoníaco a la acrilato-CoA seguida de la hidrólisis del tioéster de CoA (Herrmann et al., 2005).

### Biosíntesis del ácido pantoténico (vitamina B5)

La vitamina B5 o ácido pantoténico es parte del complejo vitamínico B, se incluye en la categoría de vitaminas hidrosolubles. Su nombre deriva del griego "pantothen", que significa "en todas partes"; debido a que se pueden encontrar

pequeñas cantidades de ácido pantoténico en todos los alimentos, siendo abundante en cereales integrales, legumbres, levaduras, jalea real, huevos y carne. Esta vitamina es sintetizada por bacterias, plantas, levaduras y hongos; en los mamíferos se adquiere de la dieta dado que estos no lo producen.

El ácido pantoténico es una vitamina esencial para el mantenimiento celular; es sintetizada de *novo* por bacterias, como *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Leonardi, Zhang, Rock, & Jackowski, 2005), plantas como *Arabidopsis thaliana* (Ottenhof et al., 2004), levaduras y hongos, como *Neurospora crassa* (Plesofsky-Vig & Brambl, 2003). Algunos animales y patógenos no pueden sintetizar pantotenato y dependen del consumo externo de esta vitamina; algunos ejemplos de estos son, *Streptococcus pneumonia*, *Lactobacillus lactis* y *Hemophilus influenzae* (Gerdes et al., 2002).

La biosíntesis del pantotenato ha sido ampliamente estudiada en enterobacterias, el modelo canónico está claramente definido en *E. coli*. La síntesis de pantotenato se produce a partir de dos metabolitos primarios: L-aspartato y  $\alpha$ -cetoisovalerato, mediante cuatro reacciones enzimáticas (fig. 6). Inicia con el intermediario de valina  $\alpha$ -cetoisovalerato, que es convertido en  $\alpha$ -cetopantoato mediante la transferencia de un grupo metil por la enzima  $\alpha$ -cetopantoato Hidroximetil transferasa (KPHMT), producto del gen *panB*; siguiendo con la reducción de este por la  $\alpha$ -cetopantoato reductasa (KPR) producto del gen *panE*, el  $\alpha$ -cetopantoato se reduce a pantoato. La segunda parte de la vía de síntesis comienza con la descarboxilación de L-aspartato mediante un aspartato descarboxilasa (ADC), producto del gen *panD*, a  $\beta$ -alanina; posteriormente es condensado el pantoato y la  $\beta$ -alanina para formar pantotenato, por el producto del gen *panC* pantotenato sintetasa (PS)(Leonardi & Jackowski, 2007).

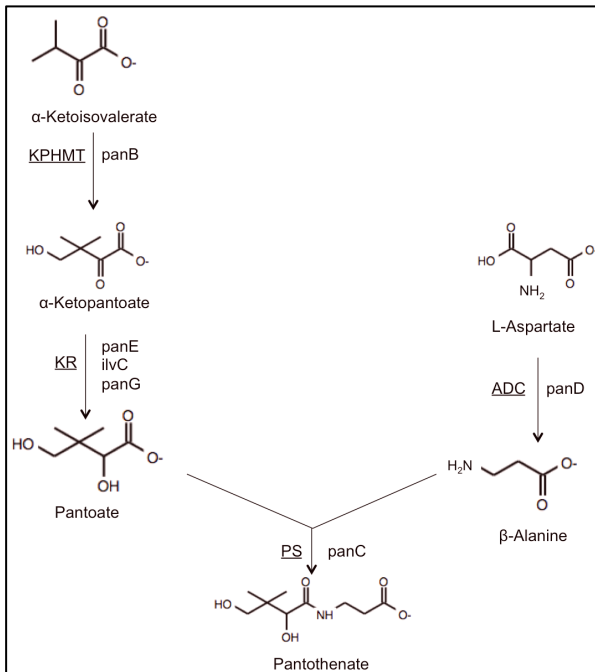


Fig. 6 Síntesis de ácido pantoténico. Comienza con formación de pantoato mediante la transferencia de un grupo metilo al  $\alpha$ -cetoisovalerato por la hidroximetiltransferasa de cetopantoato, el producto del gen *panB*, seguido de la reducción de la cetopantoato reductasa, el producto del gen *panE*. La  $\beta$ -alanina se forma a partir del aspartato por la aspartato-1-descarboxilasa, el producto del gen *panD*. El pantotenato se forma por la condensación dependiente de ATP de la  $\beta$ -alanina y el pantoato mediante la pantotenato sintetasa, el producto del gen *panC*.

El mecanismo de biosíntesis de pantotenato ha sido ampliamente estudiado en bacterias y eucariontes (Spry, Kirk, & Saliba, 2008), los genes *panBC* se encuentran ampliamente conservados y distribuidos en los diferentes dominios de vida. La organización genética de los cuatro genes para la síntesis de pantotenato marca que los genes *panBCD* se encuentran de manera consecutiva, pudiendo o no formar un operon entre ellos; el gen *panE* faltante usualmente se encuentra en alguna otra parte del cromosoma y no parece estar agrupado con los otros genes.

Hablando particularmente de procariontes, los genes *panBC* son ampliamente conservados en estos organismos, hasta la fecha no se han encontrado análogos de ellos. Así mismo, el gen *panD* no tiene análogos reportados, pero no es

ampliamente conservado en los diferentes grupos de proteobacterias. Sin embargo, de el gen panE se han descrito dos análogos funcionales dentro de las bacterias; siendo el caso de panG, una nueva cetopantoato reductasa encontrada en la especie de *francisella* (Miller et al., 2013). Por otro lado, se reporto una cetol-acido isomeroreductasa (ilvC) que suple la función de KPR en *E. coli* y *S. typhimurium* (Primerano & Burns, 1983).

#### Síntesis de Coenzima A

El ácido pantoténico formado por pantoato y  $\beta$ -alanina, es precursor en la síntesis de coenzima A; una molécula clave del metabolismo central. funciona como un portador de grupos acilo para las reacciones de formación de amida, éster y tioéster, así como la activación de grupos carbonilo para las reacciones de condensación de Claisen (White, et al. 2014). De ella se derivan compuestos tio-ésteres (acetil-CoA, malonil-CoA, succinil-CoA, etc) esenciales para el metabolismo de carbono, síntesis de proteínas y metabolismo de lípidos (Leonardi & Jackowski, 2007). Cerca del 4% de las enzimas conocidas utilizan la CoA como cofactor, además la CoA está relacionada con más de 100 diferentes reacciones del metabolismo (Leonardi et al., 2005).

La biosíntesis de CoA a partir del ácido pantoténico es realizada en cinco etapas, inicia con la fosforilación del pantotenato pasando a 4- fosfopantotenato mediante la enzima pantotenato cinasa (CoaA), después se condensa con la cisteína y es descarboxilada para formar 4-fosfopantotenoilcisteína, estas dos reacciones son catalizadas por la 4-fosfopantotenoilcisteína sintasa (CoaB) y la 4-fosfopantotenoilcisteína descarboxilasa (CoaC). Posteriormente el 4-fosfopanteteína es convertido en dephospho-coA a través de la fosfopanteteína adeniltransferasa (CoaD) y fosforilado por la dephospho-coA cinasa en el 3'OH de la ribosa para formar CoA (Fig. 7).

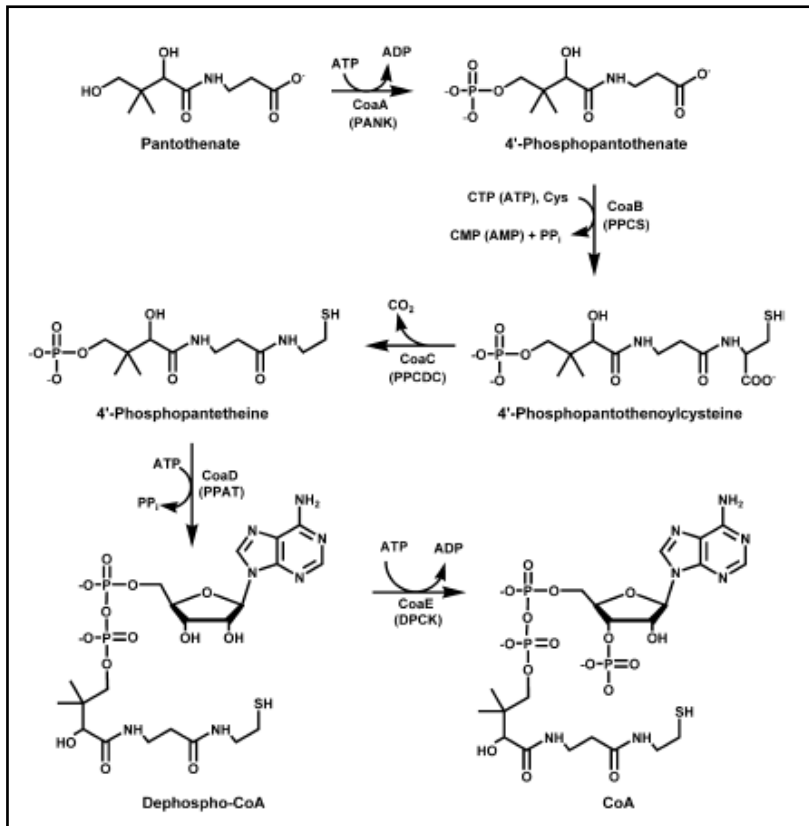


Fig. 7.- Ruta para la biosíntesis de CoA y la transferencia y el reciclaje de grupos protésicos de 4'-fosfopanteteína. Tomando pantotenato como sustrato, la pantotenato sintasa, producto del gen *coaA*, lo fosforila. Posteriormente se agregan cisteína y CTP a 4'-fosfopantotenato en una reacción de dos pasos para producir 4'-fosfopanteteína por el producto bifuncional del gen *coaBC*. La fosfopanteteína adenililtransferasa, el producto del gen *coaD*, agrega el resto adenina a la 4'-fosfopanteteína para formar defosfo-CoA, que a su vez es fosforilada por la quinasa defosfo-CoA, el producto del gen *coaE*, para formar CoA. La CoA se acila con un ácido graso o ácido orgánico o dona el resto 4'-fosfopanteteína a una proteína, como la proteína transportadora de acilo (ACP), para activarla. La transferencia del grupo protésico 4'-phosphopantetheine es catalizada por el producto del gen *acpS*. El grupo protésico se escinde de la proteína por una fosfodiesterasa específica de ACP codificada por el gen *acpH*. El intermedio metabólico 4'-fosfopanteteína se utiliza para la síntesis de CoA.

Vía reductiva de la degradación de uracilo.

En los seres humanos, la vía para el catabolismo del uracilo y la timina consta de tres pasos consecutivos y se limita principalmente al hígado (fig. 8). La DPD (dihidropirimidina deshidrogenasa) es la enzima inicial y limitante en el catabolismo de las bases de pirimidina y cataliza la reducción de uracilo y timina a 5,6-dihidrouracilo y 5,6-dihidrotiamina respectivamente. El segundo paso es catalizado por la dihidropirimidinasa y consiste en una hidrólisis reversible de dihidrouracilo y dihidrototiamina a N -carbamoil- $\beta$ -alanina y N -carbamoil-  $\beta$ -AIB (donde  $\beta$ -AIB significa ácido  $\beta$ -aminoisobutírico) respectivamente. Finalmente, N -carbamoil- $\beta$ -alanina o N -carbamoil- $\beta$ -AIB se convierte en  $\beta$ -alanina o  $\beta$ -AIB, amoníaco y CO<sub>2</sub> por la  $\beta$ -ureidopropionasa. Es esencialmente la misma vía en bacterias y en mamíferos.

El producto de la vía, B-alanina, es un componente central de la biosíntesis de pantotenato y ácido  $\beta$ -aminoisobutírico; en mamíferos funciona también como neurotransmisor y como precursor para la biosíntesis de carnosina.

En general, se cree que la vía de degradación de pirimidina es la ruta principal para la síntesis de  $\beta$ -alanina en seres humanos. La  $\beta$ -alanina es un análogo estructural de GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico) y glicina, que son los principales neurotransmisores inhibitorios del sistema nervioso central. Se ha sugerido que la  $\beta$ -alanina en sí misma podría funcionar como un neurotransmisor, ya que es un agonista de los receptores de glicina y GABA.

Además, la presencia de un sistema de captación de alta afinidad en las células gliales y neuronales, que regula la concentración de  $\beta$ -alanina en el cerebro, apoya el papel de la  $\beta$ -alanina en la modulación de la respuesta neuronal. Una deficiencia en una de las enzimas de la vía de degradación de pirimidina podría, por lo tanto, ir acompañada de niveles disminuidos de  $\beta$ -alanina y conducir a una actividad neurológica anormal.

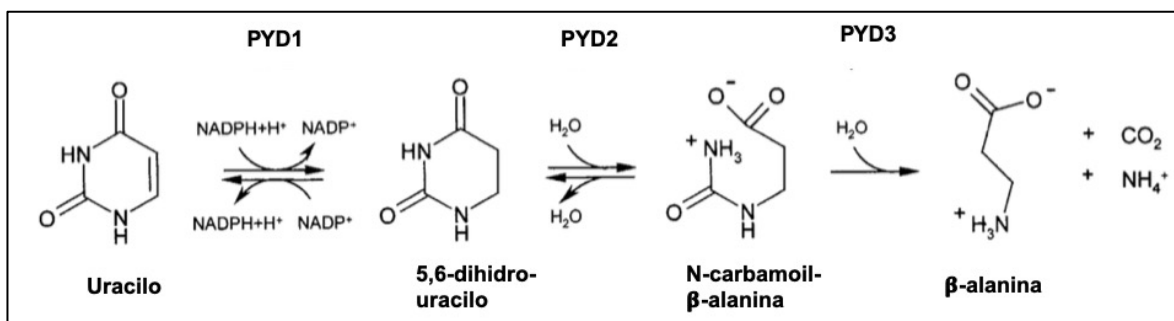


Figura 8.- Vía de degradación de uracilo mediante las enzimas dihidropirimidina deshidrogenasa (PYD1), dihidropirimidinasa (PYD2) y la b-alanina sintasa (PYD3).

$\beta$ -alanina sintasa como enzima de estudio, características y potencial biotecnológico.

La b-alanina sintasa, N-carbamoyl-b-alanina amidohidrolasa ó b-ureidopropionasa, como también se le conoce, pertenece al grupo de enzimas EC. 3.5.1.6. En este grupo se clasifican enzimas que actúan sobre amidas lineales, que a su vez tienen la función de hidrolasas sobre derivados carbamoil de aminas. Dada esta particularidad, en este grupo encontramos D- y L-N-carbamoyl amidohidrolasas, las cuales pueden hidrolizar enantioespecíficamente el grupo amida del grupo carbamoil en D- o L-N-carbamoyl-amino ácidos, produciendo el correspondiente aminoácido enantioméricamente puro, amonio y  $\text{CO}_2$  (fig. 9).

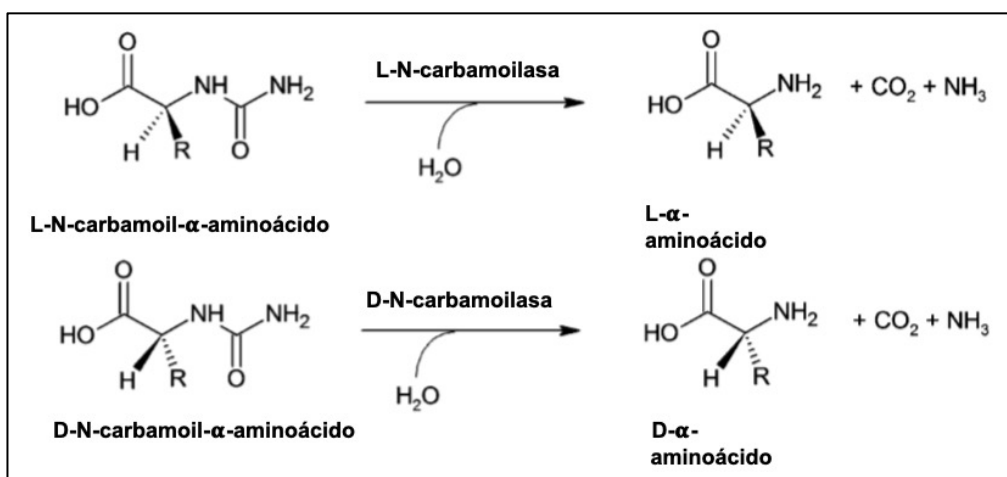


Fig. 9.- Reacción general de una L- o D-carbamoylase.

Debido a esta peculiaridad, este grupo de enzimas ha obtenido gran interés a nivel industrial en la producción de L- y D aminoácidos. Su estereoespecificidad y promiscuidad de sustratos, han hecho que este grupo de enzimas sean de gran relevancia y ampliamente estudiadas (Martínez-Rodríguez et al., 2010).

La b-alanina sintasa pertenece al grupo de las D-carbamoilasas, estas actúan bajo un pH de 7.0 a 9.0; generalmente son termoestables, actúan en un rango de 30 a 70 °C. Utilizan cofactores metálicos como:  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ ; presentan inhibición por altas concentraciones de metales como:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , entre otros.

## **Descripción de los rizobios.**

---

Rhizobios es el nombre común con el que se denomina a un grupo de bacterias Gram-negativas, ubicadas taxonómicamente dentro de la división de las alfa proteobacterias, dentro del orden rhizobiales y agrupadas dentro de la familia *Rhizobiaceae*. En esta familia se encuentran, entre otros, los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Weir, 2011). Su hábitat es la rizósfera, una zona rica en moléculas orgánicas alrededor de las raíces de las plantas; sin embargo, también se les puede encontrar en el interior de las raíces de sus plantas hospedadoras.

Durante la asociación simbiótica las rhizobias inducen en la planta hospedadora la formación de una estructura denominada nódulo, dentro de este las bacterias sufren una serie de cambios morfológicos y fisiológicos, transformándola en un bacteroide (Oldroyd & Downie, 2008). Finalmente se lleva a cabo la reacción que cataliza la reducción de nitrógeno atmosférico en amoníaco, mediante la enzima nitrogenasa. El amoníaco pasa a las células vegetales ayudando al crecimiento de la planta, quien brinda ácidos di-carboxílicos y glutamato a los bacteroides, lo que



les permite mantener activo el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y producir suficiente ATP para el funcionamiento de la nitrogenasa (Margolin, 2014).

La importancia agrícola de este grupo de bacterias radica en su capacidad para suministrar nitrógeno a las plantas leguminosas mediante el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno. *Rhizobium etli* es la especie más abundante en suelos de América Latina donde se siembra frijol, una de las cepas mejor caracterizada es la CFN42, aislada de raíces de frijol cultivado en Guanajuato, México (Martínez-Romero, 2003).

### **Generalidades de *Rhizobium etli* CFN42.**

---

Su genoma, totalmente secuenciado en el Centro de Ciencias Genómicas (CCG) de la UNAM, está constituido por un cromosoma circular de 4.3 Mb y seis plásmidos denominados p42a (194.2 kb), p42b (184.3 kb), p42c (250.9 kb), p42d (371.2 kb) p42e (505.3 kb) y p42f (642.5 kb). En suma, los plásmidos representan el 32% del genoma total (Gonzalez et al., 2006), esta cantidad de material genético extra-cromosomal es un evento poco común en el ámbito bacteriano.

Desde hace varios años la investigación se ha centrado en identificar las funciones codificadas en los plásmidos implicados en la simbiosis y en la vida saprofita de esta bacteria, para ello uno de los pasos principales fue la obtención de una colección de mutantes derivadas de la cepa parental CFN42, las cuales carecen de cada uno de sus plásmidos. Mediante el estudio de estas mutantes en diferentes condiciones de cultivo se identificó que la mutante que carece del plásmido p42f (642.5 kb), presenta una severa deficiencia de crecimiento en un medio químicamente definido o comúnmente llamado medio mínimo (MM), constituido por una fuente de carbono (succinato), una fuente de nitrógeno ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y sales minerales ( $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ).

Además, por el análisis de estas mutantes, se sabe que dos de los plásmidos de *R. etli* CFN42 (p42b y p42d) han sido de gran relevancia para su evolución, ya que

le han permitido pasar del estado saprófito en la rizosfera, a la colonización de un nuevo nicho ecológico: el interior de los pelos radiculares de las plantas de frijol (Brom et al., 1992).

Con el antecedente del plásmido p42f, se inicio la búsqueda de proteínas codificadas en la secuencia de este plásmido que pudieran estar asociadas al crecimiento en medio mínimo. Adicionalmente, con el estudio de la vida saprofita de la bacteria se sabe que la *R. etli* CFN42 tiene la capacidad de crecer en medio mínimo (MM) sin embargo, al realizar estudios de la mutante comparada con la cepa silvestre en un medio rico, constituido por peptona y extracto de levadura, no se observa una deficiencia en el crecimiento. Lo que llevo a la búsqueda en la secuencia del plásmido F, encontrando que la única enzima catalasa se encuentra en este plásmido y que una mutante sin actividad de catalasa presenta una ligera reducción de crecimiento en MM (Vargas et al, 2003). Sin embargo, al complementar esta mutante con el gen *KatG* no mejora su crecimiento en medio mínimo, lo que indica que la falta de este gen no es la causante de la deficiencia de crecimiento. Debido a esto se intento complementar el crecimiento de la mutante agregando al medio de cultivo diferentes fuentes de carbono, aminoácidos y algunas vitaminas, pero la única forma de que la mutante recupere su fenotipo es cuando por conjugación se le regresa a su genoma el plásmido p42f.

El plásmido p42f tiene un tamaño de 642.5 kb en el cual están codificadas 573 proteínas. De ellas 134 son hipotéticas y 36 son proteínas sin homólogos en las bases datos, lo que nos da un total de 403 proteínas organizadas en clases funcionales (Gonzalez et al., 2006). En la búsqueda de las proteínas asociadas al crecimiento en medio mínimo se encontró que inmediatamente después del replicador básico de este plásmido (*rep ABC*), se encuentran dos genes denominados *panC* y *panB* formando un posible operón. Los análisis de similitud sugieren que el gene *panC* codifica para una posible pantoato-beta alanina ligasa, esta enzima cataliza la condensación de pantoato con beta-alanina para formar pantotenato, también llamado vitamina B5. Inmediatamente después del codón de

término de la traducción de PanC se encuentra el codón de inicio de la traducción de PanB, de acuerdo con los análisis de similitud, esta proteína podría ser una alfa-ketopantoato hidroximetil-transferasa, encargada de catalizar la síntesis de de alfa-ketopantoato un precursor de pantoato. Teóricamente, ambas enzimas deben ser necesarias para catalizar dos pasos distintos de la vía de síntesis de pantotenato.

La relevancia del pantotenato para cualquier célula, radica en que esta vitamina forma parte de la molécula coenzima A (CoA). Reportes en la literatura indican que mutantes auxótrofos de pantotenato recuperan total crecimiento con la adición de pantotenato en un rango de 1 a 10 uM. Para el caso de la mutante que carece del plásmido p42f solo se logró una complementación parcial de su crecimiento después de la adición de concentraciones muy altas de pantotenato (500 uM). Posiblemente una explicación de este hecho sería que el transporte de pantotenato en esta mutante es deficiente por lo que al agregarlo en el medio no se complementa totalmente su crecimiento.

## **ANTECEDENTES**

---

Características de la vía de síntesis y transporte de pantotenato en *R. etli* CFN42.

Los resultados obtenidos llevaron a profundizar en el estudio de la vía de síntesis de pantotenato, esto permitió definir algunas diferencias importantes entre la vía de síntesis y transporte descrita en enterobacterias, y lo que sucede en los Rhizobiales. La primera diferencia encontrada en la reconstrucción de la vía de síntesis de pantotenato realizada con un programa computacional (pathwaytools <http://bioinformatics.ai.sri.com/ptools/>). De acuerdo con esta predicción bioinformática, las posibles enzimas que participan en la síntesis de esta vitamina en *R. etli* CFN42 se encuentran distribuidas en tres de sus seis replicones, lo cual contrasta con la localización cromosomal en enterobacterias. La segunda diferencia importante proviene de los análisis de similitud, de acuerdo a los cuales, en el genoma de *R. etli* CFN42 está ausente un ortólogo del gene *panF*. En el

modelo de *E. coli*. *PanF* es una proteína encargada de co-transportar pantotenato y sodio al interior de la célula. La tercera diferencia proviene de los análisis de similitud, los cuales indican que en el genoma de *R. etli* CFN42 no existe un ortólogo de *panD*, este gen en enterobacterias codifica para una aspartato 1-descarboxilasa la cual cataliza la descarboxilación de L-aspartato para producir beta-alanina. Debido a que esta molécula es un precursor de pantotenato, mutantes de *E. coli* en *panD* requieren de beta-alanina o pantotenato para crecer. De acuerdo con la base de datos de KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>) la ausencia de un aspartato 1-descarboxilasa típica de bacterias no es solo una peculiaridad de *R. etli* CFN42, sino que está ausente en la mayoría de los Rhizobiales secuenciados a la fecha. Basados en la reconstrucción de vías metabólicas hecha por KEGG, la única posible vía de síntesis de beta-alanina en todas las rhizobias que carecen de PanD, sería por medio de la degradación de uracilo. Lo importante de este hecho es que hasta ahora, se ha considerado como un dogma que la síntesis de beta-alanina en bacterias proviene únicamente de la reacción catalizada por PanD, lo cual no parece cumplirse en algunas rhizobias. También es interesante mencionar que la síntesis de beta-alanina a partir de la degradación de uracilo hasta ahora se considera una vía de síntesis exclusiva de plantas y levaduras (Duhazé et al., 2003). (Mazus, 1972; Duhaze, 2003; Raman, 2004). Es importante resaltar la posibilidad de que una nueva isoforma de la enzima aspartato 1-descarboxilasa, hasta ahora no descrita en bacterias, esté presente en algunas rhizobias.

*R. etli* CFN42 es protótrofa de pantotenato ya que crece en medio mínimo sin la adición de esa vitamina. La deficiencia de crecimiento en medio mínimo de una mutante curada del plásmido p42f nos llevó a descubrir que en esta bacteria los genes *panCB* están localizados en este replicón (Villaseñor et al, 2011). En contraste con la organización de los genes *panCBD* de enterobacterias, en *R. etli* CFN 42 el gene *panD* no se encuentra contiguo a *panCB*, de hecho en la anotación del genoma no se encuentra descrito el gene *panD* o su producto la aspartato descarboxilasa (ADC). Los programas de búsqueda de similitud BLASTn

y BLASTP no encontraron en el genoma de *R. etli* un gen homólogo a *panD* o una proteína homóloga ADC de *E. coli*. Mediante el análisis bioinformático de 204 genomas de alfa-proteobacterias se realizó una tabla de ausencia /presencia de los genes involucrados en la síntesis de b-alanina.

Tabla 1.- Ocurrencia de los genes para la síntesis de Pantotenato en los Rhizobiales.

orden	Organismo	Vía de síntesis de pantotenato					
		KAR	KPHMT	PS	ADC	KPR	panZ
Rhizobiales	Afipia_sp_1NLS2	1	1	1	1	3	0
	Agrobacterium_fabrum_str_C58	1	1	1	1	0	2
	Agrobacterium_radiobacter_K84	1	2	1	0	1	0
	Agrobacterium_sp_H13-3	1	1	1	0	1	0
	Agrobacterium_tumefaciens_F2	1	1	1	0	0	0
	Agrobacterium_vitis_S4	1	1	1	1	1	0
	Aurantimonas_manganoxydans_SI85-9A1	1	1	1	0	0	0
	Azorhizobium_caulinodans_ORS_571	1	1	1	0	1	1
	Bartonella_bacilliformis_KC583	1	1	1	0	0	0
	Bartonella_clarridgeiae_73	1	1	1	0	0	0
	Bartonella_grahamii_as4aup	1	1	1	0	0	0
	Bartonella_henselae_str_Houston-1	1	1	1	0	0	0
	Bartonella_quintana_str_Toulouse	1	1	1	0	0	0
	Bartonella_tribocorum_CIP_105476	1	1	1	0	0	0
	Beijerinckia_indica_subsp_indica_ATCC_9039	1	1	1	1	0	0
	Bradyrhizobiaceae_bacterium_SG-6C (A. clevelandensis ATCC49720)	1	1	1	1	3	0
	Bradyrhizobium_diazoefficiens_USDA_110	1	1	2	1	4	1
	Bradyrhizobium_japonicum_USDA_6	1	1	2	1	3	0
	Bradyrhizobium_sp_BTai1	1	1	1	0	1	0
	Bradyrhizobium_sp_ORS_278	1	0	1	0	1	2
	Brucella_abortus_S19	1	1	1	0	0	0
	Brucella_canis_ATCC_23365	1	1	1	0	0	0
	Brucella_melitensis_bv_1_str_16M	1	1	1	0	0	0
	Brucella_ovis_ATCC_25840	1	1	1	0	0	0

Brucella_Suis_1330	1	1	1	0	0	0
Candidatus_Liberibacter_asiaticus_str_psy62	0	0	0	0	0	0
Candidatus_Liberibacter_solanacearum_CLso-ZC1	0	0	0	0	0	0
Candidatus_Midichloria_mitochondrii_IricVA	0	0	0	0	0	0
Candidatus_Odyssella_thessalonicensis_L13	0	0	0	0	0	0
Candidatus_Puniceispirillum_marinum_IMCC1322	1	1	1	0	2	0
Chelativorans_sp_BNC1	1	1	1	0	0	0
Fulvimarina_pelagi_HTCC2506	1	1	1	0	1	0
Hoeflea_halophila_KCTC_23107	1	0	0	0	1	0
Hoeflea_phototrophica_DFL-43	1	0	0	0	1	0
Hyphomicrobium_denitrificans_ATCC_51888	1	1	1	0	1	1
Hyphomicrobium_sp_MC1	1	1	1	0	2	0
Mesorhizobium_ciceri_biovar_biserrulae_WSM1271	1	3	2	0	2	1
Mesorhizobium_japonicum_MAFF303099	1	2	1	2	2	0
Mesorhizobium_lotii_NZP2037	1	3	1	2	3	0
Mesorhizobium_opportunum_WSM2075	1	3	2	0	2	0
Methylobacterium_extorquens_AM1	1	1	1	0	2	0
Methylobacterium_extorquens_PA1	1	1	1	0	2	0
Methylobacterium_nodulans_ORS_2060	1	1	1	1	3	0
Methylobacterium_populi_BJ001	1	1	1	0	2	0
Methylobacterium_radiotolerans_JCM_2831	1	1	1	0	2	0
Methylobacterium_sp_4-46	1	1	1	0	1	0
Methylocella_silvestris_BL2	1	1	1	1	2	0
Methylocystis_sp_ATCC_49242	1	1	1	0	0	0
Methylosinus_trichosporium_OB3b	1	1	1	0	1	0
Neorhizobium_galegae_HAMBI_1141	1	2	1	0	1	1
Nitrobacter_hamburgensis_X14	1	1	1	0	1	0
Nitrobacter_sp_Nb-311 <sup>a</sup>	1	1	1	0	1	0
Nitrobacter_winogradskyi_Nb-255	1	1	1	0	1	0
Ochrobactrum_anthropi_ATCC_49188	1	1	1	0	0	0
Oligotropha_carboxidovorans_OM5	1	1	1	0	3	0
Parvibaculum_lavamentivorans_DS-1	1	1	1	0	0	0

Pelagibacterium_halotolerans_B2	1	1	1	0	0	0
Rhizobium_etli_bv_mimosae_str_Mim1	1	2	1	1	2	2
Rhizobium_etli_bv_phaseoli_str_IE4803	1	2	1	0	0	1
Rhizobium_etli_CFN_42	1	2	1	0	1	2
Rhizobium_etli_CIAT_652	1	2	1	0	0	1
Rhizobium_gallicum_bv_gallicum_R602	1	1	1	1	2	1
Rhizobium_leguminosarum_bv_phaseoli_CCGM1	1	2	1	0	0	1
Rhizobium_leguminosarum_bv_trifolii_WSM2304	1	2	1	0	0	0
Rhizobium_leguminosarum_bv_viciae_3841	1	2	1	0	1	1
Rhizobium_leucaenae_USDA_9039	1	3	1	0	1	1
Rhizobium_phaseoli_Brasil_5	1	2	1	0	2	1
Rhizobium_tropici_CIAT_899	1	1	1	0	2	1
Rhodomicrobium_vannielii_ATCC_17100	1	1	1	0	0	0
Rhodopseudomonas_palustris_BisA53	1	1	1	0	2	0
Rhodopseudomonas_palustris_BisB18	1	1	1	0	2	0
Rhodopseudomonas_palustris_BisB5	1	1	1	0	3	0
Rhodopseudomonas_palustris_CGA009	1	1	1	0	3	0
Rhodopseudomonas_palustris_DX-1	1	1	1	0	2	0
Rhodopseudomonas_palustris_HaA2	1	1	1	0	3	0
Sinorhizobium_fredii_HH103	1	2	1	1	0	2
Sinorhizobium_fredii_NGR234	1	2	1	1	0	0
Sinorhizobium_medicae_WSM419	1	2	1	0	0	0
Sinorhizobium_meliloti_1021	1	2	1	0	0	0
Starkeya_novella_DSM_506	1	1	1	0	1	0
Xanthobacter_autotrophicus_Py2	1	1	1	1	1	0

- Caracterizar fenotípicamente las mutaciones de los genes correspondientes.
- Caracterizar la actividad enzimática del gen que muestre el fenotipo de auxotrofia en *R. etli* CFN42.

## Resultados


---

A continuación, se presenta el artículo donde se reporta la identificación y caracterización de la enzima *AmaB* de *Rhizobium etli* CFN42 con actividad de  $\beta$ -alanina sintasa que suple la función de la enzima ADC en la vía de síntesis de pantotenato.



## ORIGINAL ARTICLE

# A novel way to synthesize pantothenate in bacteria involves $\beta$ -alanine synthase present in uracil degradation pathway

Mariana López-Sámano<sup>1</sup> | Luis Fernando Lozano-Aguirre Beltrán<sup>1</sup> |  
Rosina Sánchez-Thomas<sup>2</sup> | Araceli Dávalos<sup>1</sup> | Tomás Villaseñor<sup>3</sup> |  
Jorge Donato García-García<sup>2</sup> | Alejandro García-de los Santos<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Programa de Ingeniería Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Tlalpan, México

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México

## Correspondence

Alejandro García-de los Santos, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM. Av. Universidad s/n Col. Chamilpa 62210, Cuernavaca, Morelos, México.  
Email: alex@ccg.unam.mx

## Abstract

Pantothenate is an indispensable vitamin precursor of the synthesis of coenzyme A (CoA), a key metabolite required in over 100 metabolic reactions.  $\beta$ -Alanine ( $\beta$ -ala) is an indispensable component of pantothenate. Due to the metabolic relevance of this pathway, we assumed that orthologous genes for  $\beta$ -alanine synthesis would be present in the genomes of bacteria, archaea, and eukaryotes. However, comparative genomic studies revealed that orthologous gene replacement and loss of synteny occur at high frequency in *panD* genes. We have previously reported the atypical plasmid-encoded location of the pantothenate pathway genes *panC* and *panB* (two copies) in *R. etli* CFN42. This study also revealed the unexpected absence of a *panD* gene encoding the aspartate decarboxylase enzyme (ADC), required for the synthesis of  $\beta$ -ala. The aim of this study was to identify the source of  $\beta$ -alanine in *Rhizobium etli* CFN42. In this study, we present a bioinformatic analysis and an experimental validation demonstrating that the source of  $\beta$ -ala in this *R. etli* comes from  $\beta$ -alanine synthase, the last enzyme of the uracil degradation pathway.

## KEYWORDS

$\beta$ -alanine, pantothenate, CoA, comparative genomics, uracil degradation, pantothenate, vitamin

## 1 | INTRODUCTION

$\beta$ -Alanine is a nonproteinogenic  $\beta$ -amino acid that occurs in all living organisms. In prokaryotes,  $\beta$ -ala is indispensable for the synthesis of pantothenate, the precursor of the essential cofactor coenzyme A (CoA). CoA is the source of 4'-phosphopantetheine for fatty acid and polyketide synthesis (Leonardi & Jackowski, 2007). In eukaryotes,  $\beta$ -amino acids and  $\beta$ -peptides play important roles in the regulation

of nutritional metabolism, immunity, and the central nervous system (Naveed Riaz, Rehman M, & Mahboob Ahmad, 2017).

The major pathway for  $\beta$ -ala synthesis in *Escherichia coli* is the decarboxylation of aspartate by aspartate decarboxylase (ADC; Cronan, 1980). The ADC protein is a pyruvoyl-dependent enzyme that is initially synthesized as a zymogen (pro-ADC). A cleavage of pro-ADC occurs between Gly24 and Ser25, creating the active-site pyruvoyl moiety. Stuecker (Stuecker, Bramhacharya,

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2020 The Authors. *MicrobiologyOpen* published by John Wiley & Sons Ltd.

Hodge-Hanson, Suen, & Escalante-Semerena, 2015) proposed two classes of ADC based on the type of cleavage of the zymogen (pro-ADC). Class I of the ADC cleavage requires the MRF (Maturation Regulatory Factor) acetyl-CoA sensor and has been found only in gammaproteobacteria. ADC Class II is an autocatalytic cleavage and is found in a wide number of bacterial phyla. Since the majority of archaea lack homologues of the *E. coli* K12 acetyl-CoA synthesis pathway genes, the mechanism of pantothenate/CoA biosynthesis has not been completely deduced in these organisms.

The pantothenate synthesis pathway, which includes a glutamate decarboxylase (GAD) that substitutes for ADC and uses pyridoxal 5'-phosphate (PLP) as a cofactor, was reported in archaea (Tomita, Yokooji, Ishibashi, Imanaka, & Atomia, 2014). Curiously, GAD prefers aspartate (Asp) rather than glutamate (Glu), as its substrate, although commonly GAD catalyzes the decarboxylation of Glu to  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA).

Although prokaryotes and eukaryotes have an indispensable requirement for  $\beta$ -ala for the synthesis of coenzyme A (CoA), the pathways involved in its synthesis are very diverse. The uracil fermenting bacterium *Clostridium uracilicum* degrades uracil to  $\beta$ -ala. Uracil or thymine is first converted to dihydrouracil. The dihydropyrimidinase enzyme catalyzes the hydration of dihydrouracil to produce *N*-carbamoyl- $\beta$ -ala, which is hydrolyzed to  $\beta$ -ala,  $\text{CO}_2$ , and  $\text{NH}_3$ , by  $\beta$ -ala synthase (Campbell, 1957).

The reductive degradation of pyrimidine as a source of  $\beta$ -ala was supported by genetic and biochemical analyses in several bacteria, including *Clostridium uracilicum* (Campbell, 1957) and *Clostridium botulinum* (Hilton, Mead, & Elsdén, 1975). Although the reductive degradation of pyrimidines has also been implicated as the *de novo* source of  $\beta$ -ala in *E. coli* auxotrophs, lack of response to dihydrouracil indicated that in these bacteria, the major pathway for  $\beta$ -ala synthesis was the decarboxylation of aspartate catalyzed by ADC.

Genschel (Genschel, 2004) performed a phyletic analysis for the occurrence of *E. coli* and human genes for in pantothenate and CoA synthesis across 47 completely sequenced genomes, 20 from the Bacteria, 16 from Archaea, and 11 from Eukarya. This study revealed a mosaic of orthologues with 20 to 70% amino acid identities. At least one protein was missing from each of the 47 analyzed genomes.

Comparative genomics using the *E. coli* pantothenate pathway genes as query against the 20 sequenced bacterial genomes revealed multiple gaps that may represent distantly related homologues due to the absence of, at least, one gene per surveyed bacterial genome (Genschel, 2004).

The *Rhizobiales* order is a heterogeneous group of Gram-negative bacteria, taxonomically located within the alphaproteobacteria division. Some of its members are facultative diazotrophs that associate with leguminous plants to carry out symbiotic nitrogen fixation. Others are pathogens of plants or animals (Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Our model is *Rhizobium etli* CFN42, which was originally isolated from bean root nodules (Martínez-Romero, 2003). Its genome consists of a circular chromosome and six large plasmids ranging in size from 194 to 642 Kb (Gonzalez et al., 2006).

In the course of examining *Rhizobium etli* CFN42 plasmids for the presence of housekeeping genes encoding essential functions, we found that both *panC* and *panB* genes were clustered together on the 642-kb replicon p42f. We demonstrated that both are indispensable for the synthesis of pantothenate (Villaseñor et al., 2011; Figure A1). Surprisingly, we did not find homologues of the *E. coli panD* gene in the genome of *R. etli* CFN42. Since strain CFN42 grows in minimal medium without exogenous pantothenate or  $\beta$ -ala, it was assumed that it is a pantothenate prototroph.

*Agrobacterium fabrum* C58 (formerly *A. tumefaciens* C58), a plant pathogen that induces tumors in numerous plants, was the only member of the *Rhizobiales* order included in Genschel's study. According to this analysis, *A. fabrum* C58 lacks ketopantoate reductase (KPR, EC 1.1.1.169) but has a putative ADC detected by a BlastP search. We performed BlastP searches in order to gain insight on the presence or absence of ADC in the genomes of rhizobial reference strains.

Several questions arise from the presence or absence of ADC in *R. etli* CFN42. Is the absence of ADC an exclusive characteristic of strain CFN42 or is it a widespread characteristic of the *Rhizobiales* order or perhaps the alphaproteobacteria?

The aim of this work was to identify the enzyme that synthesizes  $\beta$ -ala and replaces the function of ADC, allowing *R. etli* CFN42 to be a  $\beta$ -ala prototroph. We also performed an *in silico* analysis of the alphaproteobacteria group to understand the occurrence, diversity, and evolution of the enzymes involved in  $\beta$ -ala synthesis.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Bacterial strains, media, and growth conditions

The characteristics of the bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Bacterial growth was started from glycerol stocks (20%, stored at  $-70^\circ\text{C}$ ) propagated in plates of PY-rich medium (per L, 5 g peptone, 3 g yeast extract, 1 ml of  $\text{CaCl}_2$  and 15 g agar). *Rhizobium* strains were grown at  $30^\circ\text{C}$  in three different media: (a) PY-rich medium, (b) chemically defined mineral medium (MM), and (c) chemically defined mineral medium plus  $1\ \mu\text{M}$  calcium pantothenate (MMP) or  $1\ \mu\text{M}$   $\beta$ -ala, added from filter sterilized stocks. Base MM containing 10 mM succinate as carbon source, 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as nitrogen source, 1.26 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , and 0.83 mM  $\text{MgSO}_4$  was adjusted to pH 6.8 and sterilized. After sterilization, the following components were added to the final concentration indicated: 1.49 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (autoclaved separately), 0.0184 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  biotin, and 10  $\mu\text{g/ml}$  thiamine (all filter sterilized). MMP contains the same components plus  $1\ \mu\text{M}$  calcium pantothenate. *Rhizobia* strains were grown at  $30^\circ\text{C}$  for 20 hr in PY medium. *Escherichia coli* K12 MG1655 and *E. coli* BL21 (DE3) were used for cloning and to express the *R. etli*  $\beta$ -alanine synthase, respectively. *E. coli* strains were grown at  $37^\circ\text{C}$  for 20 hr in Luria-Bertani (LB) medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.2).

**TABLE 1** Bacterial strains and plasmids used in this study

Relevant Genotype		References
<i>Rhizobium etli</i> strains		
CFN42	Wild type, Nalr	Segovia, Young and Martinez Romero 1993
CFNX186	CFN42 cured of plasmid p42f; Nalr	Brom et al., 1992
CFN42	CFN42 pfΔ308–637	Brom et al., 1992
CFN42 RHE_CH02599-	CFN42 RHE_CH02599::pK18mob Kmr	This study
CFN42 amaB-	CFN42 amaB::pK18mob Kmr	This study
CFN42 amaB-/amaB <i>R. etli</i>	CFN42 amaB::pK18mob/complemented with amaB into pFAJ1708 Tc	This study
CFN42 amaB-/aam <i>R. etli</i>	CFN42 amaB::pK18mob/complemented with aam into pSRK Gm	This study
CFN42 amaB-/amaB <i>A. fab</i>	CFN42 amaB::pK18mob/complemented with amaB/ <i>A. fab</i> into pFAJ1708 Tcr	This study
CFN42 amaB-/panD <i>A. fab</i>	CFN42 amaB::pK18mob/complemented with panD/ <i>A. fab</i> into pFAJ1708 Tcr	This study
CFN42 amaB-/bioA <i>A. fab</i>	CFN42 amaB::pK18mob/complemented with bioA/ <i>A. fab</i> into pFAJ1708 Tcr	This study
CFN42 amaB-/panD <i>E. coli</i>	CFN42 amaB::pK18mob/complemented with panD/ <i>E. coli</i> into pFAJ1708 Tcr	This study
CFN42 amaB-	CFN42 amaB::pK18mob/complemented with pFAJ1708 Tc	This study
<i>Rhizobium tropici</i>		
CIAT 899	CIAT 899 aam::pK18mob Kmr	This study
CIAT 899	CIAT 899 gabt::pK18mob Kmr	This study
<i>Agrobacterium fabrum</i> C58		
fabrum C58	panD::pK18mob Kmr	This study
fabrum C58	bioA::pK18mob Kmr	This study
fabrum C58	amaB::pK18mob Kmr	This study
<i>Escherichia coli</i> and plasmid		
K-12 substr. MG1655 ΔpanD	MG1655 ΔpanD::Kan	This study
K-12 substr. MG1655 ΔpanD/panD <i>A. fab</i>	MG1655 ΔpanD::Kan/panD <i>A. fab</i> into pUC19 Cbr	This study

(Continues)

**TABLE 1** (Continued)

Relevant Genotype		References
K-12 substr. MG1655 ΔpanD/amaB <i>A. fab</i>	MG1655 ΔpanD::Kan/amaB <i>A. fab</i> into pUC19 Cbr	This study
K-12 substr. MG1655 ΔpanD/bioA <i>A. fab</i>	MG1655 ΔpanD::Kan/bioA <i>A. fab</i> into pUC19 Cbr	This study
K-12 substr. MG1655 ΔpanD/amaB <i>R. etli</i>	MG1655 ΔpanD::Kan/amaB <i>R. etli</i> into pUC19 Cbr	This study
K-12 substr. MG1655 ΔpanD/aam <i>R. etli</i>	MG1655 ΔpanD::Kan/aam <i>R. etli</i> into pUC19 Cbr	This study
K-12 substr. MG1655 ΔpanD/RHE_CH02599 <i>R. etli</i>	MG1655 ΔpanD::Kan/RHE_CH02599 <i>R. etli</i> into pUC19 Cbr	This study
K-12 substr. MG1655 ΔpanD	MG1655 ΔpanD::Kan/complemented with pUC19 Cbr	This study
DH5α	Host for recombinant plasmids; Nalr	
pK18mob	pK18, derivative mob; Kmr	Schäfer et al. 1994
pUC19	Cloning vector Cbr	
pSRK	pBBRMC-5-derived expression vector lac promoter, lacIq, lacZ α+, Gmr	Khan, Gaines, Roop and Farrand, 2008
pFAJ1708	Broad Host range cloning vector, Tcr	
pETSUMO	Protein and Peptide Expression System; His Tag (6x), SUMO Tag; Kmr	Hanington, Barreda and Belosevic, 2006
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Host for recombinant plasmids;	Thermo fisher Scientific
BL21(DE3) AmaB	pETSUMO with AmaB recombinant protein	
BL21(DE3) pETSUMO	pETSUMO empty vector	

## 2.2 | DNA manipulations

Standard techniques were used for plasmid and total DNA isolation, restriction digests, ligations, transformations, and agarose gel electrophoresis (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). Plasmid mobilization from *E. coli* to *Rhizobium* was done by conjugation on PY plates at 30°C by using overnight stationary phase cultures. Donors

(*E. coli* DH5) and recipients (*R. etli* CFN42 wild-type and mutant strains) were mixed at a 1:2 ratio, and suitable markers were used for transconjugant selection.

### 2.3 | Analysis for the occurrence of 12 proteins involved in pantothenate synthesis and phylogenetic analysis of putative ADC enzymes found in alphaproteobacteria

We selected 204 alphaproteobacteria to analyze for the presence and absence of 12 proteins related to the pantothenate synthesis and transport. The protein FASTA files (faa) for each of the genomes were downloaded from the RefSeq NCBI database. Protein sequences with an expectation value (E) of  $10^{-3}$  or less were considered as putative homologues. We used Proteinortho v5.15 to obtain the clusters of orthologous proteins from the 204 protein FASTA files. Next, we used the Pfam v31.0 database to determine which protein ortho clusters represent the 12 proteins of interest analyzed in this work. The proteins we searched for were PYD1, PYD2, PYD3, GAD, KPHMT, PS, ADC, KPR, MRF, KAR, Aam, and GabT. Finally, we determined which alphaproteobacteria were represented in each protein cluster (Table S1).

For phylogenetic analysis, we used the Pfam v31.0 database to determine which proteinortho clusters represent the ADC proteins. A total of 37 homologues belonging to alphaproteobacteria sequences were tested with a group of nine external sequences listed in Table S2 and were aligned against Muscle v3.8.31.

The resulting data set containing 46 putative ADC homologues was used to infer the evolutionary relationships. We used ProtTest3 v3.4.2 for the evolutionary model, and the best result was LG + G model, using amino acid alignment. The phylogenetic analysis was performed with PhyML v3.3.20170530 under (-d aa -m LG -a e -o ltr) parameters (Figure A2).

### 2.4 | Cloning and sequence analysis of *amaB* gene, mutants, and complemented mutant

The *amaB* (RHE\_CH03290) gene was overexpressed in *E. coli* DH5-alpha. The coding region of the *amaB* gene was amplified from the genomic DNA of *R. etli* CFN42 by PCR. The amplified fragment was inserted into the pET-SUMO expression vector (Ni-NTA Purification System; Sigma-Aldrich). After confirming the absence of mutations, the plasmid was introduced into *E. coli* strain BL21 (DE3). Primer set list is in Table A1.

### 2.5 | Overexpression and purification of wild-type $\beta$ -ureidopropionase AmaB

The transformant BL21(DE3) strain was grown in LB medium supplemented with 100 mg/ml of carbenicillin. A single colony was

transferred into 10 ml of LB medium with carbenicillin at the above-mentioned concentration in a 100-ml flask. This culture was incubated overnight at 37°C with shaking. Five hundred milliliters of LB medium with 100 mg/ml of carbenicillin was inoculated with 5 ml of the overnight culture in a 1-liter flask. After 3 hr of incubation at 37°C with vigorous shaking, the optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of the culture was 0.3–0.5. For induction of  $\beta$ -alanine synthase gene expression, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.1 mM and incubation was continued at 30°C for an additional 6 hr.

The cells were collected by centrifugation (8,000  $\times$  g, 4°C, 10 min), washed twice in wash buffer (2.5 M NaCl, 250 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM imidazole pH 8.0), and resuspended in 50 ml of the same buffer. The cells were disrupted by sonication using a UP200S ultrasonic processor, in ice for four periods of 15 s at pulse mode 0.5 and 40% sonic power. The cell debris was pelleted by centrifugation (8,000  $\times$  g, 4°C, 10 min), and the supernatant was applied to a 2-ml column of nickel metal-affinity resin (Ni-NTA Purification System; Sigma-Aldrich) and  $\beta$ -ureidopropionase purified as recommended by the manufacturer. The purified enzyme was dialyzed against 20 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, and stored at 4°C.

### 2.6 | Enzyme assays

The standard enzymatic reaction was carried out with purified AmaB at a final concentration of 1 mg/ml along with 125 mM 3-ureidopropionic acid and 10 mM MgCl<sub>2</sub> dissolved in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, in a 3 ml reaction volume (Martinez-Gomez et al., 2008). The reaction mixture was incubated at 30°C for 60 min, with the apoenzyme preincubated (1 hr) at 4°C with 2 mM of NiCl<sub>2</sub>, and 500  $\mu$ l samples were stopped for every 15 min, by the addition of 50  $\mu$ l of 3% TCA. After centrifugation, the presence of  $\beta$ -ala in the resulting supernatants was estimated by high-performance liquid chromatography (HPLC).

### 2.7 | Determination of $\beta$ -ala by HPLC/fluorescence

Determination of  $\beta$ -ala was carried out by HPLC coupled to a Multi  $\gamma$ -fluorescence detector (Waters 1525/2475) using a reverse-phase C-18 Spherisorb ODS2 column of 5  $\mu$ m particle size and 150  $\times$  4.6 mm (Waters; García-García, Peña-Sanabria, Sánchez-Thomas, & Moreno-Sánchez, 2018). Enzymatic reactions were stopped with perchloric acid (3% v/v) at the indicated times and immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -70°C. The acidic supernatants were neutralized with 3 M KOH/0.1 M Tris and centrifuged to remove KClO<sub>4</sub>. Supernatant was recovered and used for  $\beta$ -ala determination by derivatization with 37 mM ortho-phthalaldehyde (OPA).  $\beta$ -ala and  $\alpha$ -alanine standards (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) were used for identifying of chromatographic peaks.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Orthologues of the canonical L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase enzyme are predominantly absent in $\alpha$ -proteobacteria

A previous study on ADC phylogeny and amino acid conservation analyses revealed that ADCs are present in  $\gamma$ -proteobacterial genomes and most maintain the *panCBD* synteny (Stuecker et al., 2015). We noticed the absence of the *panCBD* gene cluster while functionally characterizing *panC* and *panB* in rhizobia (Villaseñor et al., 2011). In the present study, BlastP and Psi Blast searches using ADC from *E. coli* and *A. fabrum* C58 as query revealed the absence of ADC homologues in *R. etli* CFN42 and other reference strains (Table S1).

To generalize the absence of ADC homologues in  $\alpha$ -proteobacteria, we assessed the occurrence of putative ADCs in the proteome of 204 alphaproteobacteria, 84 rhizobia and 120 members of seven families of alphaproteobacteria (Table S1). The complete proteome of each bacterium was obtained from the NCBI reference sequence collection (RefSeq) and clustered with Proteinortho v5.15, a large-scale Blast-based orthology detection tool (Lechner et al., 2011; Figure A2). This analysis only showed 37 putative ADCs from 204  $\alpha$ -proteobacteria genomes.

#### 3.2 | Unrooted maximum-likelihood-based tree inferred from the alpha- and gammaproteobacteria ADCs revealed high divergence among them

An important characteristic of the alphaproteobacteria is its genome plasticity, which allows different genome rearrangements, including deletions or duplications (Prell & Poole, 2006; Tiwari & Lata, 2018). We made a phylogenetic analysis to get a wider view of the evolutionary relationship among the ADCs from the  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, and  $\epsilon$ -proteobacteria (Table S2).

The resulting maximum-likelihood-based tree is shown in Figure 1, and the data set is presented in Table S2. To determine if this ADC phylogeny maintains the coherence of species phylogeny, it was compared to the previously reported species trees performed by the Bayesian analysis of 104 concatenated alignments (Williams, Sobral, & Dickerman, 2007) and with the most recent robust species tree; this was done under the maximum-likelihood framework with a data set of 200 single-copy and conserved genes for the alphaproteobacteria (Muñoz-Gómez et al., 2019).

The majority of ADCs belonging to the *Rhizobiales* order were grouped in a single cluster (Figure 1, green oval bottom). Unexpectedly, we found two ADCs from *Bradyrhizobium japonicum* and *Afipia* sp close to  $\gamma$ - and  $\beta$ -proteobacteria (Figure 1, upper green oval). Two ADCs of the *Rhodospirillales* order (*Azospirillum brasilense* and *Magnetospirillum magneticum*) were located as orthologues of *Rhizobiales* (Figure 1, purple oval). The ADC from *Maritimibacter alkaliphilus* was located within the *Rhizobiales* order, whereas in the species tree, *M. alkaliphilus* belongs to the *Rhodobacterales* order (Muñoz-Gómez et al., 2019).

This heterogeneous cluster of *Rhizobiales* ADCs links through a long branch with remote orthologues from class alphaproteobacteria belonging to the following orders: *Rhizobiales* (*B. japonicum* and *Afipia*), *Caulobacterales* (*C. crescentus*), *Rhodobacterales* (*Hyphomonas neptuni* and *Hirschia baltica*), and *Parvularculales* (*Parvularcula bermudensis*  $\gamma$ -proteobacteria (outgroup, *E. coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*),  $\beta$ -proteobacteria (*B. pertussis* and *R. solanacearum*), and  $\epsilon$ -proteobacteria (*Corynebacterium glutamicum*)).

#### 3.3 | Presence, absence, duplications, and functional redundancy of the six *pan* genes involved in pantothenate synthesis

In addition to ADC, the 84 rhizobial genomes were surveyed for the presence of the enzymes that catalyze pantothenate synthesis. This revealed that the KPHMT (ketopantoate hydroxymethyl transferase, PanB) is highly conserved in the *Rhizobiales* order and was absent in only 8.4% of the analyzed genomes. The genera lacking KPHMT were *Bradyrhizobium* sp ORS 278, *Candidatus liberobacter* (4 strains), and *Hoeflea* (2 species). KPHMT was predicted to be present in the other members of *Rhizobiales*, which have a diversity of habitats. Two copies of this enzyme were present in 17.8% of rhizobia, mostly in the *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species. Three copies of KPHMT were found in 4.8% of the *Rhizobiales* order: three *Mesorhizobium* species and one in *Rhizobium leucaenae* (Table S1).

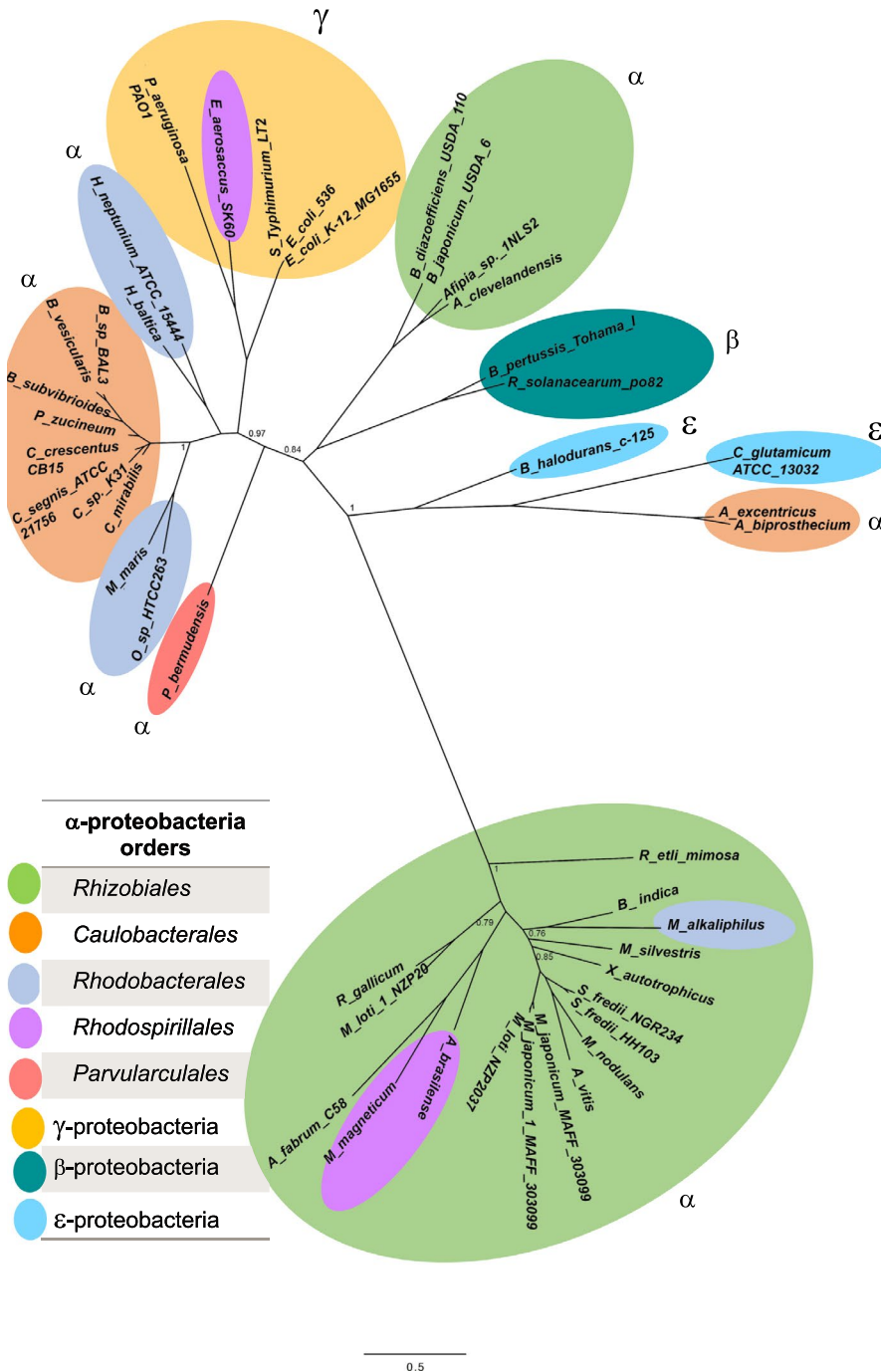
The next step in the pathway is the reduction of  $\alpha$ -ketopantoate to produce pantoate. Two enzymes can perform this reduction: KPR ( $\alpha$ -ketopantoate reductase, PanE) was found in only 57% of the rhizobial genomes, while KAR (acetohydroxy acid reductoisomerase, *ilvC*) was present in 95.2% of the genomes (Table S1). Most human, plant, and mammalian pathogens have lost the KPR enzyme. Interestingly, *Candidatus* genera lacked both KAR and KPR enzymes in their genomes.

In the last step of the pathway, pantothenate synthetase (PS, PanC) catalyzes the ATP-dependent condensation of D-pantoate with  $\beta$ -ala to form pantothenate. This enzyme was absent in 7.1% of the surveyed genomes, some of which belong to parasites such as *Hoeflea* and *Candidatus* (Table S1). Strains with a single copy were found in 88% of the analyzed rhizobia genomes. Two genes were found in 4.7% of *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* species.

The occurrence of putative ADC enzymes is shown in Table 2. An ADC encoding gene was present in 19% of the genomes, and two strains had a second copy of ADC in their genomes. *Mesorhizobium japonicum* MAFF303099 had one in a chromosome and the other one in a plasmid, and *M. loti* NZP 2037 had both in a chromosome.

The search for MRF (Maturation Regulatory Factor, *panM*) homologues revealed that 78.5% of the genomes lacked an MRF homologue; 15.4% had one copy and 6% encoded two copies. However, only five genomes coded for both ADC and MRF (*A. fabrum* C58, *Bradyrhizobium japonicum* USDA11, *R. etli* bv *mimosa* str. Mim1, *Rhizobium gallicum*, and *Sinorhizobium fredii* HH130; Table S1).





**FIGURE 1** The putative ADCs of alphaproteobacteria found in our occurrence analysis. A maximum-likelihood phylogenetic tree inferred from a subset of 204 genomes, where we extracted only 37 ADCs. The tree shows a monophyletic clade of proteins distantly related to those from γ-proteobacteria and other α-proteobacteria

Our results showed that only 16 of the 84 analyzed genomes (19.04%) encoded the complete pantothenate pathway. Of the 68 genomes with gaps in the pathway, the predominant deficiencies were a lack of ADC in 80.95% of the genomes and the absence of both ADC and KPR in 38%.

### 3.4 | *Rhizobium etli* CFN42 is a pantothenate prototroph

The model of pantothenate synthesis established in *E. coli* (Cronan, 1980; Leonardi & Jackowski, 2007) indicates that the enzymes

missing in rhizobia should cause auxotrophy. Growth assays were done in liquid chemically defined medium with *R. etli* CFN42 (lacks *panD*) and *Sinorhizobium meliloti* 1,021 (lacks *panD* and *panE*) wild-type strains, and an *R. etli* CFN42 plasmid p42f-cured strain (CFNX186) that is defective for growth in chemically defined medium without pantothenate. We found that the wild-type strains were able to grow through three subcultures in minimum medium without β-ala or pantothenate. This shows that even with the absence of *panE* and/or *panD*, rhizobia are still able to synthesize β-ala and pantothenate (Figure 2). This prototrophy contrasts with the auxotrophy exhibited by *R. etli* CFNX186, which lacks *panC* and *panB*, as well as plasmid p42f (Brom et al., 1992).

**TABLE 2** Occurrence\* of pantothenate synthesis genes on Rhizobiales order

Gene	Enzyme	Occurrence (%)
<i>panD</i>	ADC	19.04
<i>panM</i>	MRF	21.42
<i>panB</i>	KPHMT	91.66
<i>panE</i>	KPR	57.14
<i>ilvC</i>	KAR	95.23
<i>panC</i>	PS	92.85

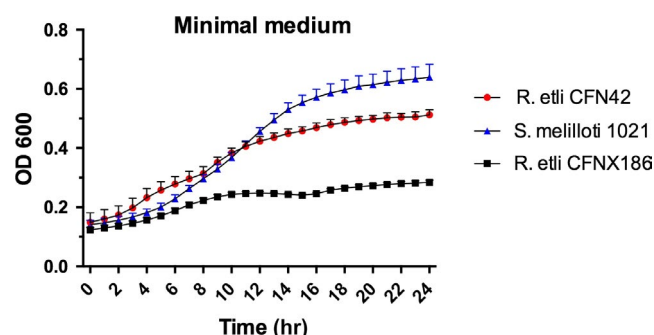
Note: \*The percentage was calculated based on the number of rhizobia bacteria that covered the sample ( $n = 84$ ).

### 3.5 | Occurrence analysis revealed different pathways that would replace ADC in rhizobia

To identify which enzyme(s) might be responsible for the synthesis of  $\beta$ -ala, we performed bioinformatic analyses of 204 alphaproteobacterial genomes to find possible pathways or genes that could potentially produce this metabolite. Based on a literature search, we selected six genes of interest that encode enzymes of the pyrimidine degradation pathway (AmaB, Dht, PyrD), glutamate decarboxylase (GAD), and the Aam and GabT transaminases (Figure 3).

It is believed that  $\beta$ -ala synthesis in bacteria results only through decarboxylation of aspartate by ADC (Cronan, Littel, & Jackowski, 1982; David & Lichstein, 1950). Other ways of producing  $\beta$ -ala exist in eukaryotes. Two routes occur in fungi: *Saccharomyces cerevisiae* produces  $\beta$ -ala by the degradation of spermine (White, Gunyuzlu, & Toyn, 2001), and *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces kluyveri* obtain it from uracil degradation (Lundgren, Gojković, Piškur, & Dobritzsch, 2003; Table S1, Figure 3).

The pyrimidine degradation pathway involves three enzymatic steps from uracil to produce  $\beta$ -ala,  $\text{CO}_2$ , and  $\text{NH}_3$  (Campbell, 1957). In the final step of the pathway,  $\beta$ -ala synthase (AmaB) uses *N*-carbamoyl- $\beta$ -alanine as substrate. In rhizobia, the in vitro activity of AmaB has been detected in *A. fabrum* C58 and *S. meliloti* 1021. The authors showed the production of  $\beta$ -ala from 3-ureidopropionic acid in vitro, in the last step of the pathway (Martínez-Rodríguez, Martínez-Gómez,

**FIGURE 2** Growth test for prototrophy of wild-type *Rhizobium etli* CFN42, its p42f-cured derivative CFNX186, and in wild-type *Sinorhizobium meliloti* 1,021. Tested in minimal medium without  $\beta$ -alanine or pantothenate

Rodríguez-Vico, Clemente-Jiménez, & Las Heras-Vázquez, 2010). In archaea,  $\beta$ -ala can be synthesized by a GAD that uses Asp as a substrate. In these studies, it was shown that two enzymes annotated as GADs had higher affinity for Asp than for Glu and they demonstrated the in vitro activity of the enzymes in *Methanocaldococcus jannaschii* and *Thermococcus kodakarensis* (Tomita et al., 2014; Wang, Xu, & White, 2014).

We also included in the study two transaminases that in bacteria, insects, and mammals produce  $\beta$ -ala in a single-step reaction. The first one, Aam, acts on L-alanine and 3-oxopropionate to produce pyruvate and  $\beta$ -ala (Dalluge, Liao, Gokarn, & Jessen, 2005; Yun, Lim, Cho, & Kim, 2004). The second, GabT, performs a transamination of malonate semi-aldehyde and L-glutamate (Nanaya, Hidenori, Keiko, tatsuhiko, Ikeda, & Takao, 1982; Wilding, Peat, Newman, & Scott, 2016).

In summary, our bioinformatic analysis showed that two transaminases and the pyrimidine degradation pathway were encoded in the *R. etli* CFN42 genome. We did not find any candidate genes for ADC or GAD, nor a complete polyamine degradation pathway.

### 3.6 | AmaB functionally complements strains lacking ADC

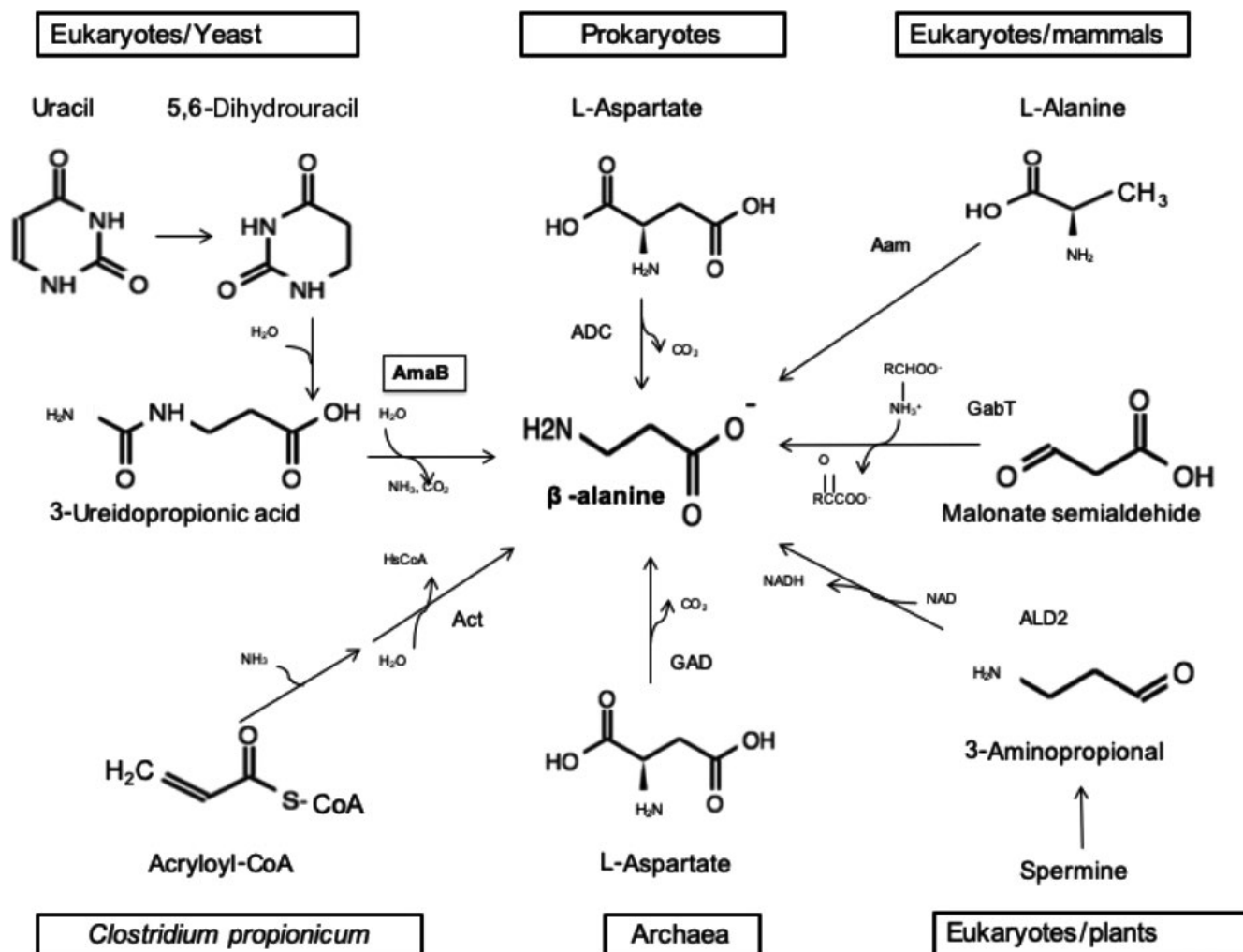
In our study, we tested the function of different genes in *R. etli*, by inactivating those that encode two transaminases (Aam and GabT) and the *amaB* gene for pyrimidine degradation (Table A1). Following with the canonical decarboxylation pathway, we found a putative  $\omega$ -amino acid decarboxylase that was different from the ADC and GAD enzymes. The genes were interrupted using a suicide plasmid, and the resulting mutants were tested for growth in defined medium without  $\beta$ -ala or pantothenate. From this screening, we found that the *amaB* mutant was auxotrophic for  $\beta$ -ala, while inactivation of the other genes caused no growth deficiency (data not shown).

*amaB* (RHE\_CH03290) is a chromosomal gene annotated as  $\beta$ -alanine synthase. It belongs to the pyrimidine degradation pathway and transforms 3-ureidopropionic acid to  $\beta$ -ala,  $\text{CO}_2$ , and ammonia. We disrupted this gene in *R. etli* CFN42 and grew the ReAM-1 (*amaB*<sup>-</sup>) mutant in mineral medium (MM) without  $\beta$ -ala or pantothenic acid. The mutant was deficient in growth, indicating a  $\beta$ -ala auxotrophy, and its growth was restored by exogenous  $\beta$ -ala or by introducing the *amaB* gene in a plasmid (Figure 4).

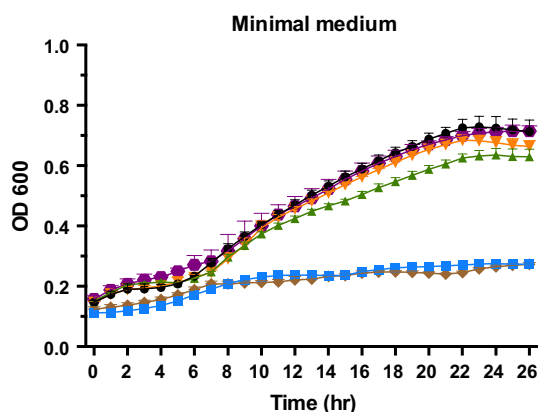
Similarly, the mutant was complemented with a plasmid-borne copy of the *amaB* gene from *A. fabrum* C58. The product of this gene has been shown to have  $\beta$ -alanine synthase activity in vitro (Martínez-Gómez et al., 2008).

### 3.7 | Purified AmaB produces $\beta$ -ala from 3-ureidopropionic acid in vitro

The his<sub>6</sub>-tag enzyme was purified in an immobilized nickel affinity column under native conditions and had a molecular mass of 60 kDa,



**FIGURE 3** β-Alanine biosynthesis in different domains of life. (AmaB) β-alanine synthase; (ADC) 1-aspartate decarboxylase; (Aam) 2,3-aminomutase; (gabT) 4-aminobutyrate transferase; (ALD2) amine oxidase; (GAD) glutamate decarboxylase; (Act) β-alanyl-CoA:ammonia lyase



**FIGURE 4** Growth in minimal medium of the *Rhizobium etli* CFN42 wild-type (●) strain and its derivative complements. *R. etli* CFN42 *amaB* mutant (■); CFN42 *amaB/amaB*<sup>+</sup> of *R. etli* CFN42 (▲); CFN42 *amaB/amaB*<sup>+</sup> of *A. fabrum* C58 (▼); CFN42 *amaB* complemented with 1 μM of β-alanine (●); CFN42 *amaB/pFAJ1708* empty vector (◆)

consistent with β-ala synthase (45 kDa), plus the 15-kDa 6His-Sumo tag (Figure A3).

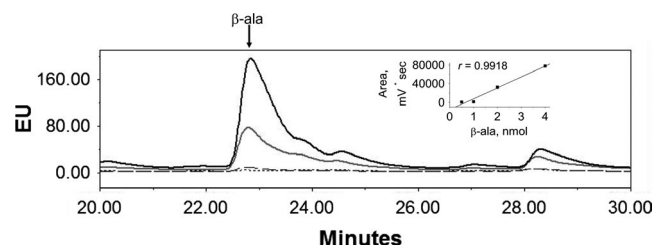
Enzymes of this type are characterized as metalloenzymes that use Ni<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> as cofactors in enzyme assays. The reaction mixture contained purified AmaB preincubated with Ni<sup>2+</sup> or Co<sup>2+</sup>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM sodium phosphate buffer, and 3-ureidopropionic acid as a substrate. We initially used a TLC system with ninhydrin detection to identify the presence of β-ala (Niederwieser et al., 1971; Figure A4). We observed enzymatic activity with both metal ions, and no product was formed in their absence.

As described below, we also performed our enzymatic assays using an HPLC system to obtain a better resolution.

### 3.8 | Synthesis of β-ala by recombinant AmaB

The *R. etli* CFN42 *amaB* gene was heterologously expressed in *E. coli* strain BL21 (DE3) and recovered by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography, as





**FIGURE 5** Standard of  $\beta$ -ala was analyzed by HPLC/fluorescence at 0.5 (dotted line), 1 (dashed line), 2 (gray line), and 4 (black line) nmols following the protocol detailed in Material and Methods. Inset shows the linear analysis of areas from each peak

previously described (Martinez-Gomez et al., 2008). Production of  $\beta$ -ala by recombinant AmaB was analyzed by HPLC. The fluorescence response of  $\beta$ -ala had a linear relation with concentration (Figure 5). The time course of recombinant AmaB activity using 3-ureidopropionic acid as substrate and  $\text{Ni}^{2+}$  as cofactor showed that  $\beta$ -ala is synthesized at a linear rate for up to 30 min (Figure 6a).  $\beta$ -ala was not detected in a reaction assay without recombinant AmaB protein (Figure 6b). The standard of  $\beta$ -ala overlapped with the peak of the compound

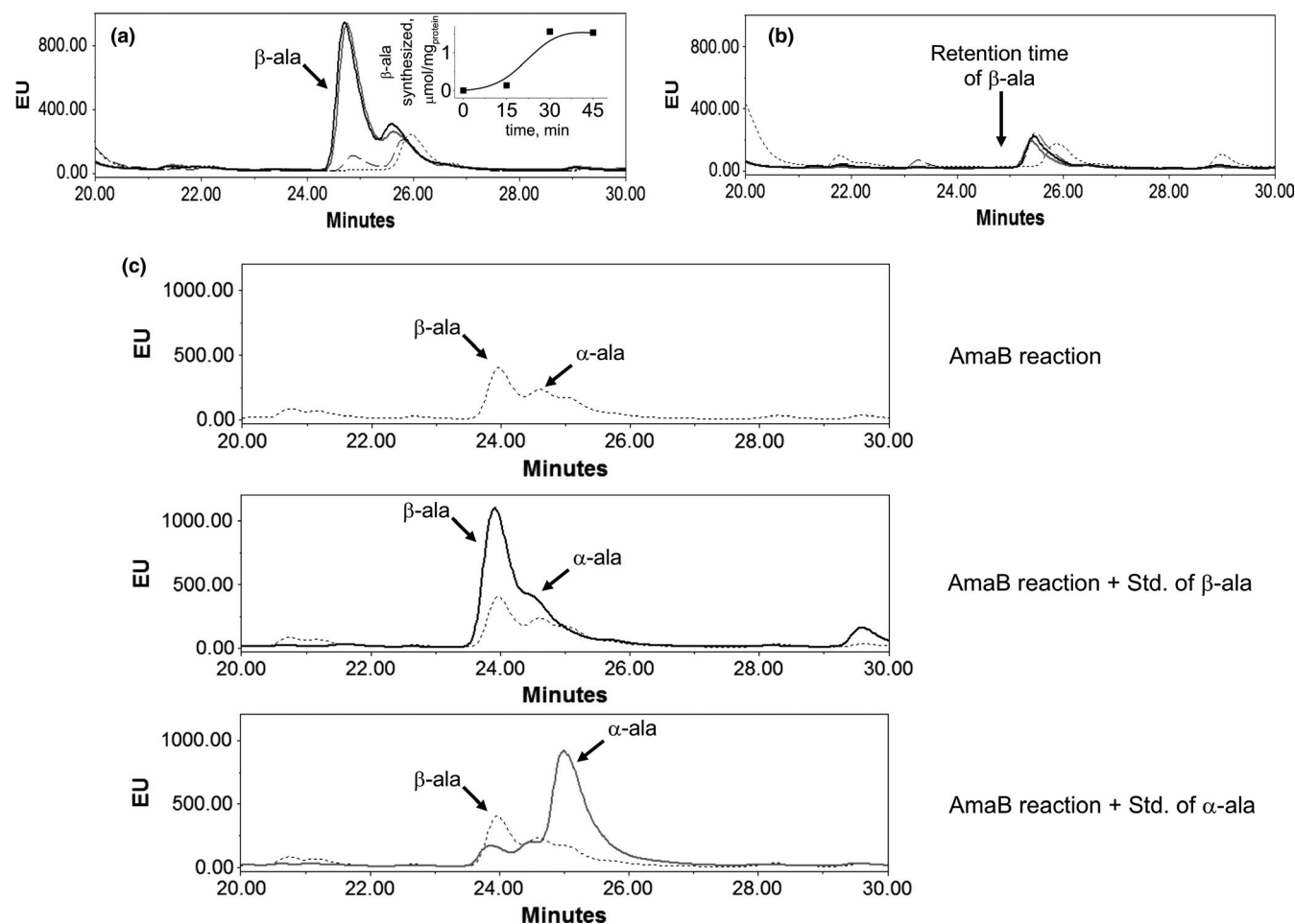
synthesized by AmaB, while the  $\alpha$ -ala standard did not (Figure 6c). These results indicated that recombinant AmaB is able to synthesize  $\beta$ -ala.

## 4 | DISCUSSION

The relevance of  $\beta$ -ala as a key component of pantothenate synthesis has been well established. However, the diversity of mechanisms described in bacteria and eukaryotes suggests that the synthesis of  $\beta$ -ala has not been totally elucidated.

Pioneer studies performed in *E. coli* and  $\gamma$ -proteobacteria defined that  $\beta$ -ala was synthesized by the decarboxylation of L-aspartate in a one-step reaction catalyzed by ADC. The concept of a canonical one-step decarboxylation reaction was for many years assumed to be the sole source of  $\beta$ -ala in bacteria.

The genomic era facilitates the comparison of pathways among numerous species (Genschel, 2004); this bioinformatic approach helped us determine the diversity of mechanisms involved in  $\beta$ -ala synthesis. In this study, we found several differences



**FIGURE 6** Analysis  $\beta$ -alanine synthesized by AmaB. (a) Activity of recombinant AmaB, at 0 (dotted line), 15 (dashed line), 30 (gray line), and 45 min (black line). Peak of  $\beta$ -ala was observed at 24.8 min. (b) Reaction without enzyme;  $\beta$ -ala peak was not observed. (c) To confirm peak of  $\beta$ -ala, internal standard of  $\beta$ -ala (black line) and L-ala (gray line) was added independently to neutralized AmaB reaction carried out for 15 min (dotted line)

between *R. etli* (alphaproteobacteria) and *E. coli* ( $\gamma$ -proteobacteria); the most intriguing was the absence of an ADC homologue in rhizobia. In previous studies, analyses of *E. coli* and other  $\gamma$ -proteobacteria revealed that  $\beta$ -ala was produced by the decarboxylation of aspartate by aspartate decarboxylase enzyme (ADC; Cronan et al., 1982); in several archaea,  $\beta$ -ala was synthesized by a glutamate decarboxylase (GAD) able to decarboxylate both aspartate and glutamate (Tomita et al., 2014). These data confirm the relevance of one-step decarboxylases, not only in bacteria but also in archaea.

An unusual alternative source of  $\beta$ -ala synthesis is the reductive degradation of pyrimidine. This three-step reaction was found in *Clostridium uracilicum* (Campbell, 1957) and *C. botulinum* (Hilton et al., 1975), as well as in *E. coli* strains: *E. coli* W, *E. coli* D2, *E. coli* 99-1, and *E. coli* 99-2 (Table S1); in contrast to previous studies, none of them was able to grow in the presence of dihydrouracil and  $\beta$ -ureidopropionic acid (Slotnick & Weinfeld, 1956).

In bacteria belonging to the *Rhizobiales* order, little is known about the metabolism of  $\beta$ -ala and pantothenate (Villaseñor et al., 2011). The occurrence analysis performed in this work indicates that our model, *R. etli* CFN42, lacks ADC and GAD, the most common one-step reaction used in bacteria to synthesize  $\beta$ -ala. We suggest that there can be functional redundancy in certain rhizobia strains. As part of our work, we constructed different single and double mutants in *A. fabrum* C58 to try to get an auxotrophic strain, but in all cases, the mutants continue to be  $\beta$ -ala prototrophic (data not shown).

Particularly for the *Rhizobiales* order, we constructed a heat map with their most representative genomes; here, we can associate the loss and prevalence of different pathways, assuming that the decarboxylation pathway is missing in most of rhizobia genomes (Figure A5).

*Sinorhizobium meliloti* and *A. fabrum* C58 have been tested for production of  $\beta$ -amino acids through the uracil degradation pathway because of their pharmaceutical relevance (Martínez-Rodríguez et al., 2010). Unexpectedly, the research only showed the ability to produce  $\beta$  and  $\omega$  amino acids in vitro; we do not know if these strains synthesize  $\beta$ -ala through this pathway or if these strains have a functional redundancy with another  $\beta$ -ala synthesis pathway.

As part of our occurrence analysis, we extended our work to alphaproteobacteria with 120 more genomes from seven different orders (Table S1). We found a correlation between the rhizobia order and alphaproteobacteria. In general, we observed that the pyrimidine degradation pathway (37%) and Aam transaminase (56%) are widely distributed in alphaproteobacteria, as well as in rhizobia (Table S1). We also observed that ADC and GAD enzymes are poorly represented in alphaproteobacteria, with 17% and 6.8%, respectively. This analysis suggests a strong correlation between the loss of the decarboxylation pathway and predominance of the pyrimidine degradation pathway in the *Rhizobiales* order and in alphaproteobacteria.

We also tested the activity of recombinant AmaB in vitro, by HPLC, to confirm the catalytic activity of this protein by showing

that it produces  $\beta$ -ala from 3-ureidopropionic acid; this corroborates the presence of alternative pathway in which bacteria produce this essential metabolite.

## 5 | CONCLUSIONS

Prokaryotes and eukaryotes require  $\beta$ -ala to synthesize CoA; however, the source of  $\beta$ -ala is quite variable even in bacteria.

For years, it has been assumed that the main source of  $\beta$ -ala in prokaryotes comes from the decarboxylation of aspartate in a single enzymatic step catalyzed by ADC. This reaction was discovered in *E. coli* and has been assumed to be the main source of  $\beta$ -ala in  $\gamma$ -proteobacteria.

This study in *R. etli* CFN42 and other alphaproteobacteria revealed a remarkable reduction of ADC orthologs in these bacteria.

The bioinformatics and experimental analyses performed with rhizobia indicate that in these alphaproteobacteria  $\beta$ -ala is synthesized through the reductive pyrimidine degradation pathway.

All these data highlight the metabolic plasticity for  $\beta$ -ala and pantothenate in bacteria.

## ACKNOWLEDGMENTS

Mariana López-Sámano is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received fellowship 295956 from CONACYT. We are grateful to Susana Brom and Michael F. Dunn for their helpful discussion and for critically reviewing the manuscript. We gratefully acknowledge Laura Cervantes and Víctor Antonio Becerra Rivera for their skillful technical assistance. This research was supported by the annual institutional budget that UNAM shares with scientists.

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Mariana López-Sámano; Formal analysis-Equal, investigation-Equal, methodology-Equal, Writing-original draft-Equal. Luis Fernando Lozano-Aguirre Beltàn; Data curation-Equal, software-supporting, supervision supporting, validation supporting. Rosina Sánchez-Thomas; Formal analysis -supporting, methodology-supporting, validation-supporting. Araceli Dávalos; Investigation-supporting, methodology-supporting, supervision-supporting. Tomás Villaseñor; Investigation-supporting, supervision-supporting. Jorge Donato García-García; Formal analysis -supporting, methodology-supporting, validation-supporting. Alejandro García- de los Santos; Conceptualization-Equal, formal analysis-Equal, funding acquisition-supporting, investigation -Equal, supervision-Equal, writing original draft-Equal.

## ETHICS STATEMENT

None required.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

All 204 data used in this study were download from RefSeq public NCBI database. The ID for each of the amino acid sequences is available through tools at different websites as described in Material and Methods, or upon request from the corresponding author. The supplementary material in the text referred to as Tables S1 and S2 was uploaded in a Zenodo data repository with DOI numbers <https://doi.org/10.5281/zenodo.3593441> and <https://doi.org/10.5281/zenodo.3593474>, respectively.

## ORCID

Alejandro García-de los Santos  <https://orcid.org/0000-0002-3387-9280>

## REFERENCES

- Brom, S., García-De-los-Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Davila, G., Romero, D., & Palacios, R. (1992). Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance. *Journal of Bacteriology*, 174(16), 5183–5189. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5183-5189.1992>
- Campbell, L. L. (1957). Reductive degradation of pyrimidines. III. Purification and properties of dihydrouracil dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 227(2), 693–700.
- Cronan, J. E. Jr (1980). Beta-alanine synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 141(3), 1291–1297. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/141/3/1291.short>.
- Cronan, J. E., Littel, K. J., & Jackowski, S. (1982). Genetic and biochemical analysis of pantothenate biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 149(3), 916–922.
- Dalluge, J. J., Liao, H., Gokarn, R., & Jessen, H. (2005). Discovery of enzymatic activity using stable isotope metabolite labeling and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(20), 6737–6740. <https://doi.org/10.1021/ac051109y>
- David, W. E., & Lichstein, H. C. (1950). Aspartic acid decarboxylase in bacteria. *Experimental Biology and Medicine*, 73(2), 216–218. <https://doi.org/10.3181/00379727-73-17632>
- García-García, J. D., Peña-Sanabria, K. A., Sánchez-Thomas, R., & Moreno-Sánchez, R. (2018). Nickel accumulation by the green algae-like *Euglena gracilis*. *Journal of Hazardous Materials*, 343, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.008>
- Genschel, U. (2004). Coenzyme A biosynthesis: Reconstruction of the pathway in archaea and an evolutionary scenario based on comparative genomics. *Molecular Biology and Evolution*, 21(7), 1242–1251. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh119>
- Gonzalez, V., Janga, S. C., Moreno-Hagelsieb, G., Jimenez-Jacinto, V., Bustos, P., Santamaria, R. I., ... Ramirez, M. A. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), 3834–3839. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508502103>
- Hanington, P. C., Barreda, D. R., & Belosevic, M. (2006). A novel hematopoietic granulin induces proliferation of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 281(15), 9963–9970.
- Hilton, M. G., Mead, G. C., & Elsdon, S. R. (1975). The metabolism of pyrimidines by proteolytic clostridia. *Archives of Microbiology*, 102(1), 145–149. <https://doi.org/10.1007/BF00428359>
- Khan, S. R., Gaines, J., Roop, R. M., & Farrand, S. K. (2008). Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(16), 5053–5062.
- Lechner, M., Findeiß, S., Steiner, L., Marz, M., Stadler, P. F., & Prohaska, S. J. (2011). Proteinortho: Detection of (Co-) orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 124. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-124>
- Leonardi, R., & Jackowski, S. (2007). Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A. *EcoSal Plus*, 2(2), 1–20. <https://doi.org/10.1128/ecosal.3.6.3.4>
- Lundgren, S., Gokjović, Z., Piškur, J., & Dobritzsch, D. (2003). Yeast  $\beta$ -alanine synthase shares a structural scaffold and origin with dizinc-dependent exopeptidases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51851–51862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308674200>
- Martínez-Gómez, A. I., Rodríguez-Vico, F., Clemente-Jiménez, J. M., Servi, S., Tessaro, D., Pozo-Dengra, J., ... Las Heras-Vázquez, F. J. (2008). Potential application of N-carbamoyl-L-alanine amidohydrolase from *agrobacterium tumefaciens* C58 for L-amino acid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 514–520. <https://doi.org/10.1128/aem.01128-08>
- Martínez-Rodríguez, S., Martínez-Gómez, A. I., Rodríguez-Vico, F., Clemente-Jiménez, J. M., & Las Heras-Vázquez, F. J. (2010). Carbamoylases: Characteristics and applications in biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 441–458. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2250-y>
- Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252(1), 11–23. <https://doi.org/10.1023/A:1024199013926>
- Martínez-Romero, E., & Caballero-Mellado, J. (1996). *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 15(2), 113–140. <https://doi.org/10.1080/07352689609701938>
- Muñoz-Gómez, S. A., Hess, S., Burger, G., Franz Lang, B., Susko, E., Slamovits, C. H., & Roger, A. J. (2019). An updated phylogeny of the Alphaproteobacteria reveals that the parasitic Rickettsiales and Holosporales have independent origins. *Elife*, 8(2013), 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.42535>
- Nanaya, T., Hidenori, O., Keiko, K., Ikeda, T., & Hama, T. (1982). Purification and properties of B-alanine aminotransferase from Rabbit Liver. *The Biochemical Journal*, 92(4), 1009–1017.
- Naveed Riaz, N., Rehman M, F. U., Mahboob Ahmad, M., & (2017). B-amino acids: Role in human biology and medicinal chemistry - A review. *Medicinal Chemistry*, 7(10), 302–307. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000472>
- Niederwieser, A., Benson, J. V., Patterson, J. A., Pataki, G., Arbor, A., & Hann, C. S. (1971). The popularity of thin-layer chromatography (TLC) for the analysis of amino acids and derivatives is astonishing. There are other techniques which give, in general, better qualitative.
- Prell, J., & Poole, P. (2006). Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology*, 14(4), 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.02.005>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Vols. 1-3. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1), 69–73.
- Segovia, L., Young, J. P. W., & Martínez, Romero E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli Type 1 strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43, 372–374.
- Slotnick, I. J., & Weinfeld, H. (1956). Dihydrouracil as a growth factor for mutant strains of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 74, 122–125 Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13475206>
- Stuecker, T. N., Bramhacharya, S., Hodge-Hanson, K. M., Suen, G., & Escalante-Semerena, J. C. (2015). Phylogenetic and amino acid conservation analyses of bacterial L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase and of its zymogen-maturation protein reveal a putative interaction

- domain. *BMC Research Notes*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1314-6>
- Tiwari, S., & Lata, C. (2018). Heavy metal stress, signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: An overview. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00452>
- Tomita, H., Yokooji, Y., Ishibashi, T., Imanaka, T., & Atomia, H. (2014). An archaeal glutamate decarboxylase homolog functions as an aspartate decarboxylase and is involved in  $\beta$ -Alanine and coenzyme A biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 196(6), 1222–1230. <https://doi.org/10.1128/JB.01327-13>
- Villaseñor, T., Dávalos, A., Lozano, L., Brom, S., Romero, D., & Garcia-De-Los-Santos, A. (2011). Housekeeping genes essential for pantothenate biosynthesis are plasmid-encoded in *Rhizobium etli* and *Rhizobium leguminosarum*. *BMC Microbiology*, 11(1), 66. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-66>
- Wang, Y., Xu, H., & White, R. H. (2014).  $\beta$ -alanine biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii*. *Journal of Bacteriology*, 196(15), 2869–2875. <https://doi.org/10.1128/JB.01784-14>
- White, W. H., Gunyuzlu, P. L., & Toyn, J. H. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* is capable of de Novo Pantothenic acid biosynthesis involving a novel pathway of  $\beta$ -alanine production from spermine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10794–10800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009804200>
- Wilding, M., Peat, T. S., Newman, J., & Scott, C. (2016). A  $\beta$ -alanine catabolism pathway containing a highly promiscuous  $\omega$ -transaminase in the 12-aminododecanate-degrading *Pseudomonas* sp. Strain AAC. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3846–3856. <https://doi.org/10.1128/aem.00665-16>
- Williams, K. P., Sobral, B. W., & Dickerman, A. W. (2007). A robust species tree for the alphaproteobacteria. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4578–4586. <https://doi.org/10.1128/JB.00269-07>
- Yun, H., Lim, S., Cho, B., & Kim, B. (2004). B-amino acid: Pyruvate transaminase from. *Microbiology*, 70(4), 2529–2534. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2529>

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** López-Sámano M, Beltrán LFL-A, Sánchez-Thomas R, et al. A novel way to synthesize pantothenate in bacteria involves  $\beta$ -alanine synthase present in uracil degradation pathway. *MicrobiologyOpen*. 2020;00:e1006. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1006>

## APPENDIX 1

Mutant	Primer	
CFN42 RHE_CH02599-	5'ATC CTC GAA TTC AAG GCT CTA AGC TGC C 3'	Forward
	5' TGT GAA GGA TCC GCG CTT CAC AAA 3'	Reverse
CFN42 amaB-	5'- CGT GCA GGA TCC GGA CTT CGC CTA TAA C -3'	Forward
	5'- GAG CTT AAG CTT GTC GGG TGA GCG GAT G -3'	Reverse
CFN42 amaB-/amaB <i>R. etli</i>	5'- ATC CGC AAG CTT AAA ACC AAA GGC AAC T -3'	Forward
	5'- GAA GGT GGA TCC AAG GGT CGG ATG A -3'	Reverse
CFN42 amaB-/aam <i>R. etli</i>	5'- CAT GAT GGA TCC GTT TGC GTT GTC CAG A -3'	Forward
	5'- CCC ATC GAA TTC GTT TTG CCG CCG AAT A -3'	Reverse
CFN42 amaB-/amaB <i>A. fab</i>	5'- CGC CAT GGA TCC GCA ATG GCT GTT ATC T -3'	Forward
	5'- CTG CCG GAA TTC ATC CTG ATG TCT GCC T -3'	Reverse
CFN42 amaB-/panD <i>A. fab</i>	5'- CCG ATG AAG CTT CGA CAA AGA TCG GCA A -3'	Forward
	5'- GAT GTC GAA TTC GAA CCT CTG GTC GCC T -3'	Reverse
CFN42 amaB-/panD <i>E. coli</i>	5'- CAC CAG GAA TTC CAT CGT CTC CAG CGA A -3'	Forward
	5'- GGT GAG AAG CTT GCC GCA GGG ATA ACA A -3'	Reverse
BL21 (DE3) AmaB/pETSUMO	5'ATGGTGGCAGCACCAGGCGAGAATGC-3'	Forward
	5'- TCACACCACGATCTCCGCCGTCTCCACC-3'	Reverse

TABLE A1 Primer list

Abbreviations: *R. etli*, *Rhizobium etli*; *A. fab*, *Agrobacterium fabrum*; *E. coli*, *Escherichia coli*.

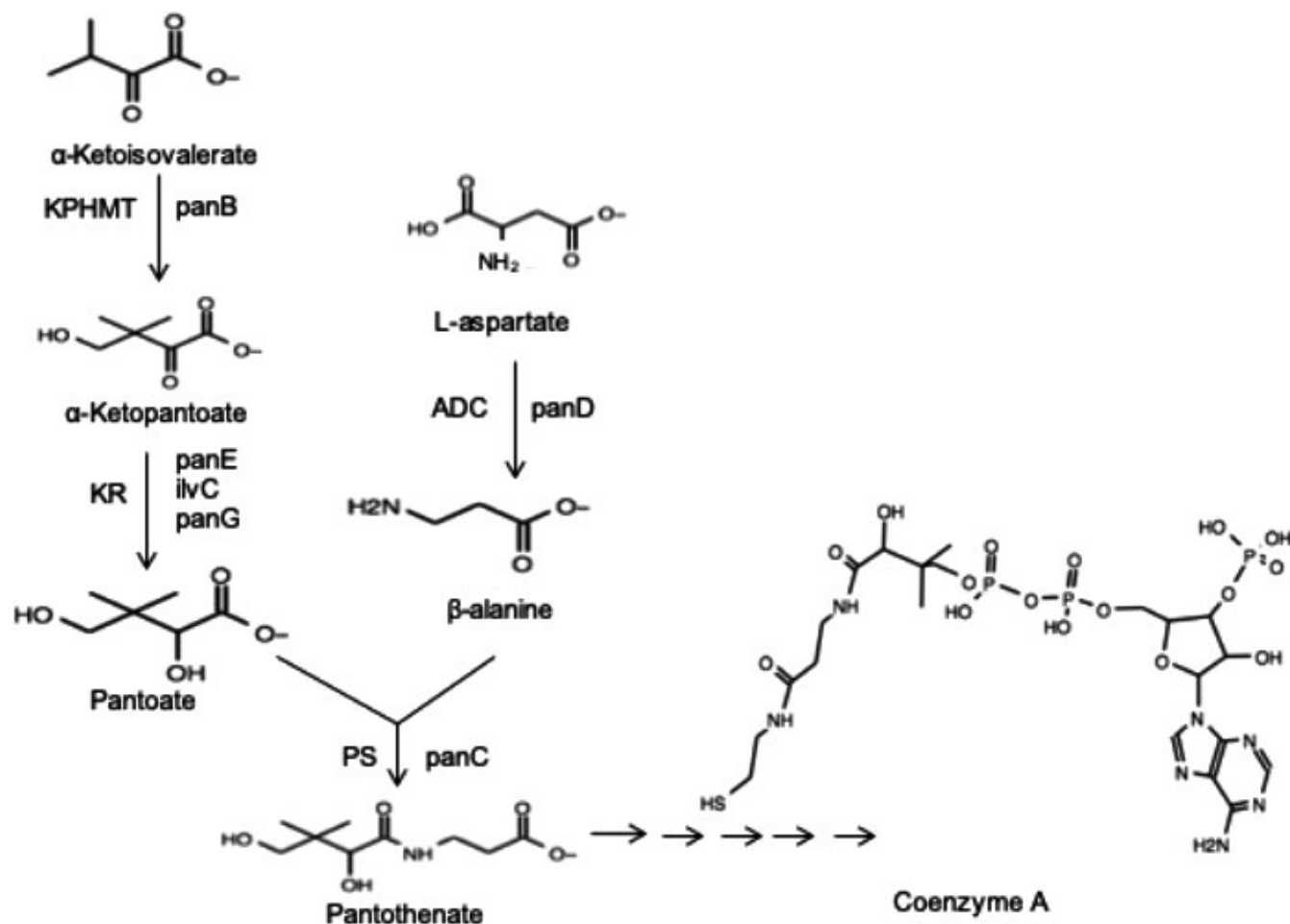


FIGURE A1 Pantothenate and CoA biosynthetic pathway

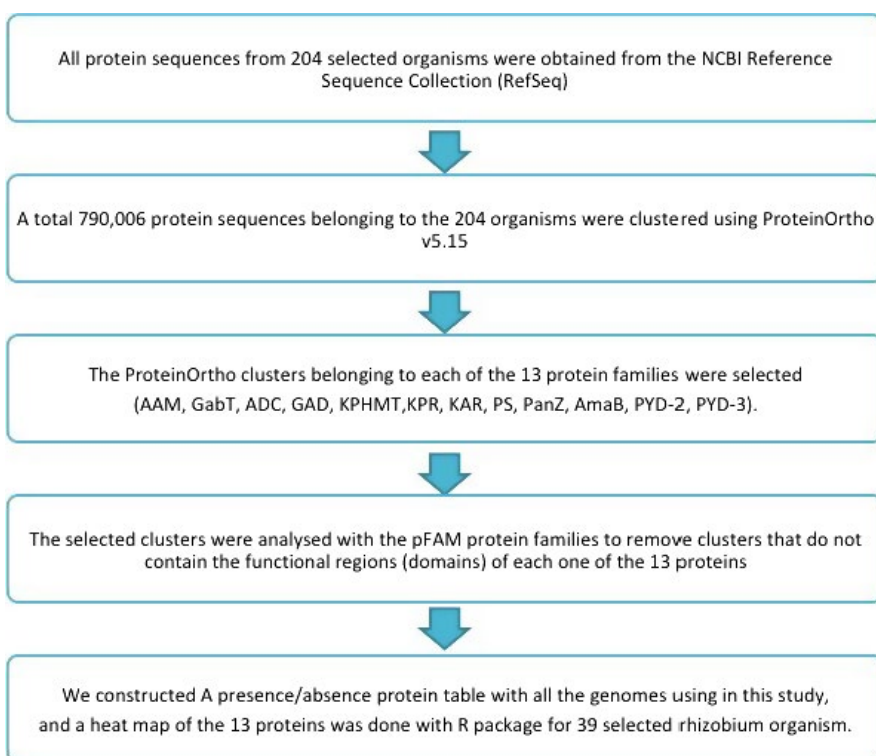
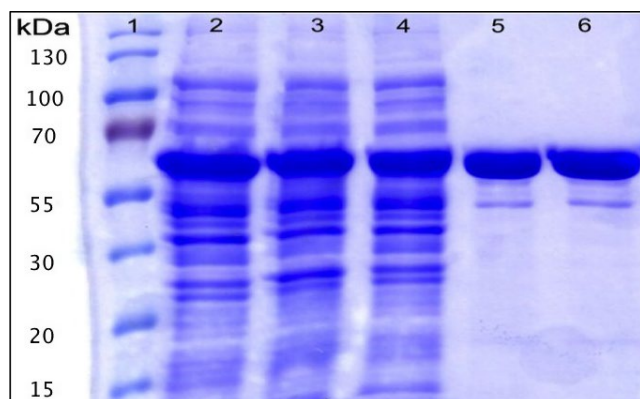
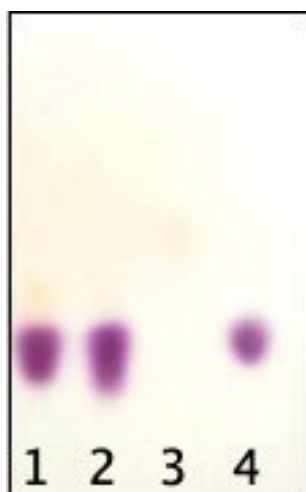


FIGURE A2 Flow diagram of the bioinformatics search methodology

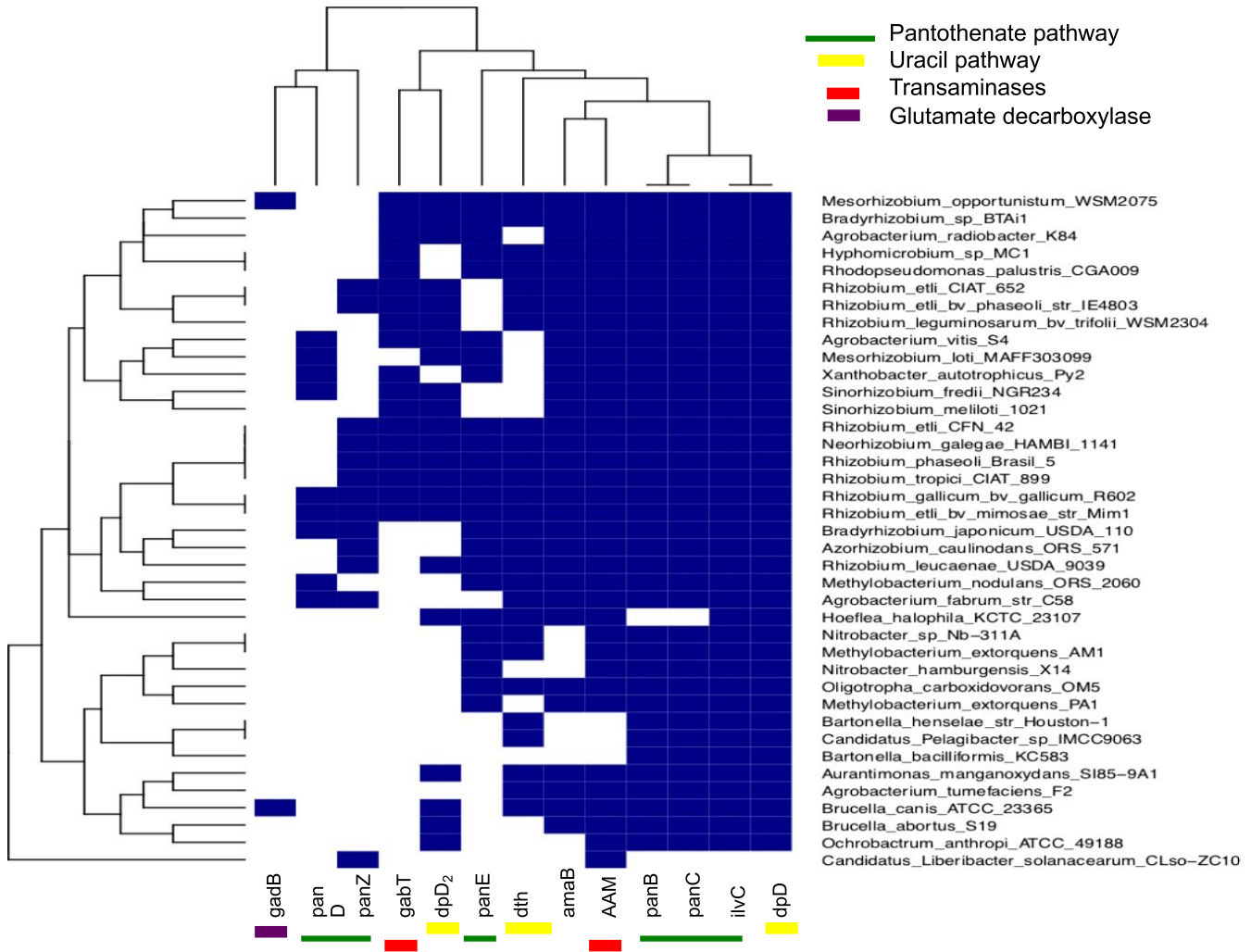


**FIGURE A3** SDS-PAGE analysis of the His6-3-Ureidopropionase produced by *Escherichia coli* harboring pETSUMO. Lane 1: Protein size marker, lane 2: cell extract after 6h of induction at 30°C, lane 3: insoluble fraction, lane 4: soluble fraction after induction, lanes 5-6: elution fraction, lane 7: elution fraction after filtration by 30 kDa amikon, lane 8: concentrated elution fraction with glycerol



**FIGURE A4** TLC enzymatic reactions plate revealed with ninhydrin. (1) Test reaction; (2) Reaction with  $\beta$ -ala; (3) Control reaction without enzyme; (4)  $\beta$ -ala standard





**FIGURE A5** Alternatives pathways or enzymes that can act in the absent of ADC enzyme. Heat-map constructed with 40 representative Rhizobiales genomes

Table S1.- Occurrence analysis in alpha-proteobacteria, represented by number of copies of each gene on strain genome.

clase	orden	organismo	Biosynthesis pathway								Gene			
			Pyrimidine degradation			Pantothenate pathway					Tansaminases		Decarboxylase	
			PYD3	PYD2	PYD1	KAR	KPHMT	PS	ADC	KPR	panZ	AAM	GabT	GAD
		Afipia_sp_1NLS2	1	1	1	1	1	1	1	3	0	1	0	0
		Agrobacterium_fabrum_str_C58	1	1	1	1	1	1	1	0	2	2	0	0
		Agrobacterium_radiobacter_K84	1	0	1	1	2	1	0	1	0	2	1	0
		Agrobacterium_sp_H13-3	1	1	1	1	1	1	0	1	0	2	0	0
		Agrobacterium_tumefaciens_F2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	0	0
		Agrobacterium_vitis_S4	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
		Aurantimonas_manganoxydans_SI85-9A1	1	3	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
		Azorhizobium_caulinodans_OR571	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
		Bartonella_bacilliformis_KC583	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		Bartonella_clarridgeiae_73	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		Bartonella_grahamii_as4aup	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		Bartonella_henselae_str_Houston-1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		Bartonella_quintana_str_Toulouse	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		Bartonella_tribocorum_CIP_105476	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		Beijerinckia_indica_subsp_indica_ATCC_9039	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
		Bradyrhizobiaceae_bacterium_SG-6C (A. clevelandensis ATCC49720)	1	1	1	1	1	1	1	3	0	2	0	0
		Bradyrhizobium_diazoefficiens_USDA_110	1	2	1	1	1	2	1	4	1	2	0	0
		Bradyrhizobium_japonicum_USDA_6	1	4	1	1	1	2	1	3	0	2	0	0
		Bradyrhizobium_sp_BTai1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	2	1	0
		Bradyrhizobium_sp_OR5278	1	4	1	1	0	1	0	1	2	1	1	0
		Brucella_abortus_S19	1	0	1	1	1	1	0	0	0	2	0	0
		Brucella_canis_ATCC_23365	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	0	1
		Brucella_melitensis_bv_1_str_16M	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	0	0
		Brucella_ovis_ATCC_25840	1	0	1	1	1	1	0	0	0	2	0	1
		Brucella_Suis_1330	1	2	1	1	1	1	0	0	0	2	0	1



## Rhizobiales

Candidatus_Liberibacter_a siaticus_str_psy62	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Candidatus_Liberibacter_s olanacearum_CLso-ZC1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Candidatus_Midichloria_mi tochondrii_IricVA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Candidatus_Odyssella_the ssalonicensis_L13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Candidatus_Puniceispirillu m_marinum_IMCC1322	1	0	1	1	1	1	0	2	0	0	0	0
Chelativorans_sp_BNC1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
Fulvimarina_pelagi_HTCC 2506	0	2	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
Hoeflea_halophila_KCTC_ 23107	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Hoeflea_phototrophica_DF L-43	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
Hyphomicrobium_denitrific ans_ATCC_51888	0	1	1	1	1	1	0	1	1	2	1	0
Hyphomicrobium_sp_MC1	1	1	1	1	1	1	0	2	0	2	1	0
Mesorhizobium_ciceri_biov ar_biserrulae_WSM1271	1	2	1	1	3	2	0	2	1	2	1	0
Mesorhizobium_japonicum MAFF303099	1	0	1	1	2	1	2	2	0	3	1	0
Mesorhizobium_lotii_NZP2 037	1	3	1	1	3	1	2	3	0	3	1	0
Mesorhizobium_opportunis tum_WSM2075	1	2	1	1	3	2	0	2	0	2	1	1
Methylobacterium_extorqu ens_AM1	0	1	1	1	1	1	0	2	0	1	0	0
Methylobacterium_extorqu ens_PA1	1	0	1	1	1	1	0	2	0	2	0	0
Methylobacterium_nodulan s_ORS_2060	1	2	1	1	1	1	1	3	0	3	0	0
Methylobacterium_populi_ BJ001	0	1	1	1	1	1	0	2	0	1	0	0
Methylobacterium_radiotol erans_JCM_2831	2	0	1	1	1	1	0	2	0	2	1	0
Methylobacterium_sp_4-46	0	1	1	1	1	1	0	1	0	4	0	0
Methylocella_silvestris_BL 2	0	1	1	1	1	1	1	2	0	1	0	0
Methylocystis_sp_ATCC_4 9242	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Methylosinus_trichosporiu m_OB3b	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
Neorhizobium_galegae_H AMBI_1141	1	1	1	1	2	1	0	1	1	1	1	0
Nitrobacter_hamburgensis _X14	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
Nitrobacter_sp_Nb-311A	0	1	1	1	1	1	0	1	0	2	0	0
Nitrobacter_winogradskyi_ Nb-255	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0

Ochrobactrum_anthropi_A TCC_49188	0	0	1	1	1	1	0	0	0	2	0	0
Oligotropha_carboxidovorans_OM5	1	1	1	1	1	1	0	3	0	1	0	0
Parvibaculum_lavamentorans_DS-1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	2	0	1
Pelagibacterium_halotolerans_B2	1	2	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
Rhizobium_etli_bv_mimosae_str_Mim1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	3	1	0
Rhizobium_etli_bv_phaseoli_str_IE4803	1	1	1	1	2	1	0	0	1	2	1	0
Rhizobium_etli_CFN_42	1	1	1	1	2	1	0	1	2	2	1	0
Rhizobium_etli_CIAT_652	1	1	1	1	2	1	0	0	1	2	1	0
Rhizobium_gallicum_bv_gallicum_R602	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	0
Rhizobium_leguminosarum_bv_phaseoli_CCGM1	1	1	1	1	2	1	0	0	1	2	1	0
Rhizobium_leguminosarum_bv_trifolii_WSM2304	1	1	1	1	2	1	0	0	0	2	1	0
Rhizobium_leguminosarum_bv_viciae_3841	1	2	1	1	2	1	0	1	1	2	1	0
Rhizobium_leucaenae_USDA_9039	1	1	1	1	3	1	0	1	1	3	0	0
Rhizobium_phaseoli_Brasil_5	1	1	1	1	2	1	0	2	1	2	1	0
Rhizobium_tropici_CIAT_899	1	1	1	1	1	1	0	2	1	1	1	0
Rhodocyclidium_vannielii_ATCC_17100	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
Rhodopseudomonas_palustris_BisA53	0	0	1	1	1	1	0	2	0	2	0	0
Rhodopseudomonas_palustris_BisB18	1	0	1	1	1	1	0	2	0	1	1	0
Rhodopseudomonas_palustris_BisB5	1	0	1	1	1	1	0	3	0	2	0	0
Rhodopseudomonas_palustris_CGA009	1	1	1	1	1	1	0	3	0	2	1	0
Rhodopseudomonas_palustris_DX-1	1	1	1	1	1	1	0	2	0	2	1	0
Rhodopseudomonas_palustris_HaA2	1	0	1	1	1	1	0	3	0	2	1	0
Sinorhizobium_fredii_HH103	1	1	1	1	2	1	1	0	2	3	1	0
Sinorhizobium_fredii_NGR234	1	0	1	1	2	1	1	0	0	3	1	0
Sinorhizobium_medicae_WSM419	1	0	1	1	2	1	0	0	0	1	1	0
Sinorhizobium_meliloti_1021	1	0	1	1	2	1	0	0	0	2	1	0
Starkeya_novella_DSM_506	1	3	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0

alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Xanthobacter_autotrophicus_Py2	1	0	1	1	1	1	1	0	2	1	0
		Ahrensia_sp_R2A130	0	2	1	1	0	0	0	1	1	0	0
		Citricella_sp_SE45	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
		Dinoroseobacter_shibae_DFL_12	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
		Hirschia_baltica_ATCC_49814	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0
		Hyphomonas_neptunium_ATCC_15444	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1
		Jannaschia_sp_CCS1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
		Ketogulonigenium_vulgarum_WSH-001	1	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0
		Labrenzia_aggregata_IAM_12614	1	2	1	1	1	1	0	1	1	3	1
		Labrenzia_alexandrii_DFL-11	1	2	1	1	1	1	0	0	0	1	0
		Maricaulis_maris_MCS10	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
		Maritimibacter_alkaliphilus_HTCC2654	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
		Oceanibulbus_indolifex_H-EL-45	1	2	1	1	0	0	0	1	0	0	1
		Oceanicaulis_sp_HTCC2633	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
		Oceanicola_batsensis_HTCC2597	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
		Oceanicola_granulosus_HTCC2516	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
		Octadecabacter_antarcticus_238	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
		Octadecabacter_antarcticus_307	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1
		Paracoccus_denitrificans_PD1222	2	2	1	1	1	1	0	1	0	1	1
		Paracoccus_sp_TRP	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
		Pelagibaca_bermudensis_HTCC2601	0	2	1	1	1	1	0	1	2	2	0
		Phaeobacter_gallaeciensis_DSM_17395	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0
		Pseudovibrio_sp_FO-BEG1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	2	0
		Rhodobacteraceae_bacterium_HTCC2083	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
		Rhodobacteraceae_bacterium_HTCC2150	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
		Rhodobacteraceae_bacterium_KLH11	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
		Rhodobacterales_bacterium_HTCC2255	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
		Rhodobacterales_bacterium_Y4I	1	2	1	1	1	1	0	0	0	2	0
		Rhodobacter_capsulatus_SB_1003	0	1	1	1	1	1	0	0	0	2	1

[illegible]

Sphingomonadales	Rickettsia_bellii_OSU_85-389	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rickettsia_canadensis_str_McKiel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rickettsia_conorii_Malish_7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rickettsia_endosymbiont_of_Ixodes_scapularis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rickettsia_felis_URRWXC al2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rickettsia_prowazekii_str_Madrid_E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rickettsia_sibirica_246	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Rickettsia_typhi_str_Wilming ton	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Wolbachia_sp_wRi	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Blastomonas_sp_RAC04	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
	Citromicrobium_bathymarinum_JL354	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	Citromicrobium_sp_JLT1363	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
	Novosphingobium_aromaticivorans_DSM_12444	0	0	1	1	1	1	0	2	0	1	1	0
	Novosphingobium_capsulatum_NBRC_12533	0	0	1	1	1	1	0	2	0	2	1	0
	Novosphingobium_nitrogenifigens_DSM_19370	0	0	1	1	1	1	0	0	0	2	1	0
	Novosphingobium_sp_PP1Y	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
	Sphingobium_chlorophenolicum_L-1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
	Sphingobium_japonicum_UT26S	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
	Sphingobium_sp_SYK-6	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
	Sphingobium_yanoikuyae_XLDN2-5	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	Sphingomonas_paucimobilis_NBRC_13935	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
	Sphingomonas_sp_S17	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
	Sphingomonas_sp_SKA58	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
	Sphingomonas_wittichii_RW1	0	0	1	1	1	1	0	2	0	1	1	0
	Sphingopyxis_alaskensis_RB2256	0	0	1	1	1	1	0	0	0	2	0	0
	Sphingopyxis_macroglabrida_strain_203	0	0	1	1	1	1	0	0	1	2	0	0
	Zymomonas_mobilis_subsp_mobilis_ATCC_10988	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	Zymomonas_mobilis_subsp_pomaceae_ATCC_29192	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Rhodospirillales	Acetobacter_pasteurianus_ IFO_3283-01	1	0	1	1	1	1	0	2	0	2	1	0
	Acetobacter_pomorum_D M001	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
	Acidiphilium_cryptum_JF-5	1	0	1	1	1	1	0	2	0	1	1	0
	Azospirillum_brasilense_S p245	1	1	1	1	1	1	1	2	0	2	1	0
	Azospirillum_lipoferum_4B	2	2	1	1	1	1	0	2	0	1	1	0
	Azospirillum_sp_B510	2	0	1	1	1	1	0	2	0	0	1	0
	Enhydrobacter_aerosaccus _SK60	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	Erythrobacter_litoralis_HT CC2594	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	Erythrobacter_sp_NAP1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
	Erythrobacter_sp_SD-21	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	Gluconacetobacter_diazotr ophicus_PAI_5	1	2	1	1	1	1	0	1	0	2	1	0
	Gluconacetobacter_hanse nii_ATCC_23769	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
	Gluconacetobacter_sp_SX CC-1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	2	1	0
	Gluconacetobacter_xylinus _NBRC_3288	1	2	1	1	0	1	0	0	0	2	0	0
	Gluconobacter_oxydans_6 21H	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
	Granulibacter_bethesdensi s_CGDNIH1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1
	Magnetospirillum_magnetic um_AMB-1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
	Rhodospirillum_rubrum_AT CC_11170	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
Caulobacteriales	Asticcacaulis_biprosthecu m_C19	0	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	0
	Asticcacaulis_excentricus_ CB_48	0	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	0
	Brevundimonas_diminuta_ ATCC_11568	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
	Brevundimonas_sp_BAL3	0	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0
	Brevundimonas_subvibrioi des_ATCC_15264	0	1	1	2	1	1	1	1	0	1	0	0
	Brevundimonas_vesicularis _FDAARGOS_289	0	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0
	Caulobacter_crescentus_C B15	0	0	1	1	1	1	1	0	0	2	0	0
	Caulobacter_mirabilis_FW C_38	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
	Caulobacter_segnis_ATCC _21756	0	1	1	1	1	1	1	0	0	2	0	0
	Caulobacter_sp_K31	0	0	1	1	1	1	1	1	0	2	0	0
	Phenylobacterium_zucineu m_HLK1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1

Magnetoc	Loktanella_vestfoldensis_S KA53	1	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
	Magnetococcus_marinus_MC-1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
Parvularculales	Parvularcula_bermudensis_HTCC2503	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Pelagibacterales	Candidatus_Pelagibacter_sp_HTCC7211	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	Candidatus_Pelagibacter_sp_IMCC9063	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	Candidatus_Pelagibacter_ubique_HTCC1062	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		PYD3	PYD2	PYD1	KAR	KPHMT	PS	ADC	KPR	panZ	AAM	GabT	GAD
		108	123	187	183	167	170	35	44	28	137	68	14

Table S2.- ADC phylogeny data set

Accession number	Organims	Order	Class
WP_0093402	<i>Afipia</i> sp. 1NLS2	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
NP_356949	<i>Agrobacterium fabrum</i> str. C58	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0416991	<i>Agrobacterium vitis</i>	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0027130	<i>Afipia clevelandensis</i>	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0123835	<i>Beijerinckia indica</i>	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
NP_768736	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0281441	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 6	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0109135	(1) <i>Mesorhizobium japonicum</i> MAFF 303099	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0109160	<i>Mesorhizobium japonicum</i> MAFF 303099	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0198632	(1) <i>Mesorhizobium loti</i> NZP2037	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0198633	<i>Mesorhizobium loti</i> NZP2037	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0159320	<i>Methylobacterium nodulans</i>	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0125900	<i>Methylocella silvestris</i>	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0209190	<i>Rhizobium etli</i> bv. Mimosae str. Mim1	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0401142	<i>Rhizobium gallicum</i>	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0143319	<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
YP_0028234	<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0121143	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	<i>Rhizobiales</i>	a-proteobacteria
WP_0062710	<i>Asticcacaulis biprosthecium</i>	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0134778	<i>Asticcacaulis excentricus</i>	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0082631	<i>Brevundimonas</i> sp. BAL3	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0132701	<i>Brevundimonas subvibrioides</i>	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0666264	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
NP_421098	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0996228	<i>Caulobacter mirabilis</i>	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0109201	<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0122875	<i>Caulobacter</i> sp. K31	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0125231	<i>Phenylobacterium zucineum</i>	<i>Caulobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0133008	<i>Parvularcula bermudensis</i>	<i>Parvularculales</i>	a-proteobacteria
EEV21831.1	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> SK60	<i>Rhodospirillales</i>	a-proteobacteria
WP_0141979	<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>Rhodospirillales</i>	a-proteobacteria
WP_0113863	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	<i>Rhodospirillales</i>	a-proteobacteria
WP_0158280	<i>Hirschia baltica</i>	<i>Rhodobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0116463	<i>Hyphomonas neptunium</i> ATCC 15444	<i>Rhodobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0116440	<i>Maricaulis maris</i>	<i>Rhodobacterales</i>	a-proteobacteria
WP_0098031	<i>Oceanicaulis</i> sp. HTCC2633	<i>Rhodobacterales</i>	a-proteobacteria



WP_0083357	<i>Maritimibacter alkaliphilus</i>	<i>Rhodobacterales</i>	α-proteobacteria
YP_224431	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	<i>Corynebacteriales</i>	[?]-proteobacteria
WP_0108978	<i>Bacillus halodurans</i> c-125	<i>Bacillales</i>	[?]-proteobacteria
NP_414673	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655	<i>Enterobacteriales</i>	[?]-proteobacteria
ABG68179.1	<i>Escherichia coli</i> 536	<i>Enterobacteriales</i>	[?]-proteobacteria
NP_459185	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium str. LT2	<i>Enterobacteriales</i>	[?]-proteobacteria
F6FYI9 F6F	<i>Ralstonia solanacearum</i> Po82	<i>Burkholderiales</i>	[?]-proteobacteria
NP_880521	<i>Bordetella pertussis</i> Tohama I	<i>Burkholderiales</i>	[?]-proteobacteria
NP_253419	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	<i>Pseudomonadales</i>	[?]-proteobacteria

Identificación del gen *amaB* que codifica para una  $\beta$ -alanina sintasa que produce la auxotrofia de este aminoácido en *R. etli* CFN42.

Derivado del análisis bioinformático de ocurrencia de genes para la síntesis de pantotenato, decidimos ampliar la búsqueda hacia vías alternas para la síntesis de  $\beta$ -alanina; tomando un grupo de alfaproteobacterias se realizó nuevamente el análisis. Con los genes blanco encontrados en las distintas cepas de referencia procedimos a realizar mutaciones en estos (*amab*, *aam*, *gabt*). Al obtener una cepa autótrofa en la síntesis de  $\beta$ -alanina en *R. etli* CFN42 decidimos analizar genética y químicamente el gen responsable de este fenotipo, para contestar la pregunta ¿Quién suple a la enzima ADC en la síntesis de  $\beta$ -alanina en los Rhizobiales? Por lo que, se propuso la siguiente hipótesis.

## **Hipótesis**

---

- En los rhizobios, la  $\beta$ -alanina no se sintetiza a partir de la descarboxilación de aspartato sino por una vía alterna como en otros organismos.

## **Objetivos:**

---

### **Objetivo Gral.**

Contribuir al estudio de la diversidad metabólica bacteriana determinando como sintetizan beta alanina los rhizobios que carecen de un homólogo de ADC.

### **Objetivos específicos:**

- Realizar mutaciones en los genes encontrados en el genoma de *R. etli* CFN4; como posibles alternativas de acuerdo con la predicción de KEEG y con los análisis informáticos.

## DISCUSION

---

La relevancia de la  $\beta$ -alanina como componente clave en la síntesis de pantotenato ha sido ampliamente estudiada. Sin embargo, la diversidad de mecanismos descritos en eucariontes, arqueas y bacterias sugiere que la síntesis de este metabolito no ha sido completamente elucidada.

Cronan y colaboradores llevaron a cabo estudios en *E. coli* y  $\gamma$ -proteobacterias, definiendo que la  $\beta$ -alanina se sintetiza a partir de la descarboxilación de aspartato por la enzima L-aspartato descarboxilasa en una reacción de un solo paso. Estableciendo el concepto de una reacción canónica de descarboxilación como única vía de síntesis de este metabolito en procariontes, siguiendo la idea de *E. coli* como organismo modelo universal.

La era genómica facilitó la comparación de vías metabólicas entre numerosas especies (Genschel, 2004); este enfoque bioinformático nos ayudó a determinar la diversidad de mecanismos involucrados en la síntesis de  $\beta$ -ala. En este estudio, encontramos varias diferencias entre *R. etli* (alphaproteobacteria) y *E. coli* ( $\gamma$ -proteobacteria); Lo más intrigante fue la ausencia de un homólogo de ADC en los *Rhizobiales*. En estudios previos, los análisis de *E. coli* y otras  $\gamma$ -proteobacterias revelaron que la  $\beta$ -ala se produce unicamente por la descarboxilación de aspartato mediante la enzima aspartato descarboxilasa (ADC) (Cronan et al., 1982); En varias arqueas se descubrió que la  $\beta$ -ala se sintetiza por una glutamato descarboxilasa (GAD), capaz de descarboxilar tanto el aspartato como el glutamato (Tomita et al., 2014).

Una fuente alternativa inusual de síntesis de  $\beta$ -ala es la vía de degradación reductiva de pirimidinas. Esta reacción de tres pasos se encontró en: *Clostridium uracilicum* (Campbell, 1957), *C. botulinum* (Hilton et al., 1975), así como en cepas de *E. coli*: *E. coli* W, *E. coli* D2, *E. coli* 99-1 y *E. coli* 99-2 (Tabla S1); en contraste con estudios previos, ninguno de ellos pudo crecer en presencia de dihidrouracilo y ácido  $\beta$ -ureidopropiónico (Slotnick y Weinfeld, 1956).

En las bacterias que pertenecen al orden *Rhizobiales* se sabe poco sobre el metabolismo de  $\beta$ -ala y pantotenato (Villaseñor et al., 2011). El análisis de ocurrencia realizado en este trabajo indica que nuestro modelo, *R. etli* CFN42, carece de ADC y GAD, la reacción de un paso más común utilizada en bacterias para sintetizar  $\beta$ -ala. Sugerimos que puede haber redundancia funcional en ciertas cepas de rizobios. Como parte de nuestro trabajo, construimos diferentes mutantes simples y dobles en *A. fabrum* C58 para tratar de obtener una cepa auxotrófa, pero en todos los casos los mutantes continúan siendo prototrófas  $\beta$ -ala (datos no mostrados).

Particularmente para el orden Rhizobiales, construimos un mapa de calor con sus genomas más representativos; aquí podemos asociar la pérdida y la prevalencia de diferentes vías, suponiendo que la vía de descarboxilación no se encuentra en la mayoría de los genomas de rizobios (fig. A5).

*S. meliloti* 1021 y *A. fabrum* C58 han sido probados para la producción de  $\beta$ -aminoácidos a través de la vía de degradación del uracilo debido a su relevancia farmacéutica (Martínez-Rodríguez et al., 2010). Inesperadamente, la investigación solo mostró la capacidad de producir aminoácidos  $\beta$  y  $\omega$  in vitro; no sabemos si estas cepas sintetizan  $\beta$ -ala a través de esta ruta o si estas cepas tienen una redundancia funcional con otra ruta de síntesis de  $\beta$ -ala.

Como parte de nuestro análisis de ocurrencia, ampliamos nuestro trabajo a las alfa-proteobacterias con 120 genomas más de siete órdenes diferentes (Tabla S1). Encontramos una correlación entre el orden de rizobios y las alfa-proteobacterias. En general, observamos que la vía de degradación de pirimidina (37%) y la transaminasa Aam (56%) están ampliamente distribuidas en las alfa-proteobacterias, así como en la rizobia (Tabla S1). También observamos que las enzimas ADC y GAD están pobremente representadas en las alfa-proteobacterias, con 17% y 6.8% respectivamente. Este análisis sugiere una

fuerte correlación entre la pérdida de la vía de descarboxilación y el predominio de la vía de degradación de pirimidina en el orden Rhizobiales y en las alfaproteobacterias.

También probamos la actividad de AmaB recombinante in vitro, por HPLC, para confirmar la actividad catalítica de esta proteína al mostrar que produce  $\beta$ -ala a partir del ácido 3-ureidopropiónico; Esto corrobora la presencia de una vía alternativa en la que las bacterias producen este metabolito esencial.

## CONCLUSIONES

---

Se obtuvo una mutante en el gen *amaB* con fenotipo de auxotrofia por  $\beta$ -alanina, la cual se complementa químicamente con  $\beta$ -alanina y al colocar la mutante con el gen completo mediante el uso de un plásmido.

Adicionalmente se complemento la mutante en el gen *amaB* con la su homologo *amaB* de *A. fabrum* C58, la cual ya ha sido reportada como  $\beta$ -alanina sintasa y caracterizada en la síntesis de  $\beta$ -alanina in vitro.

Se encontró que la vía de degradación de uracilo es funcional dentro del genoma de *R. etli* CFN42.

Mediante el uso de esta vía sugerimos se produce la  $\beta$ -alanina, ya que no se encontró una descarboxilasa típica, atípica o promiscua que pudiera llevar a cabo esta reacción dentro del genoma de *R. etli* CFN42.

Se comprobó la actividad de la enzima recombinante *AmaB* in vitro, mediante la identificación del producto de la reacción por HPLC.

Adicionalmente encontramos que la transaminasa *AAM* complementa el crecimiento de la mutante en el gen *panD*, en el fondo genómico de *E. coli* K12 MG1655.

Se realizaron mutaciones sencillas en los genes *panD*, *amaB*, *bioA*, *glsA*, así como la mutante doble *panD-amaB*; sin obtener un fenotipo de auxotrofia dentro de esta cepa, lo que nos lleva a sugerir redundancia funcional en los Rhizobiales.

## PERSPECTIVAS

---

1.- Realizar la caracterización enzimática de *AmaB* respecto al diferente uso de sustratos, así como de cofactores metálicos.

1.1.- Obtener los diferentes parámetros cinéticos que involucra la caracterización de una enzima, valores como  $V_{max}$  y  $K_m$ . Para esto se necesita medir la actividad enzimática con diferentes cantidades de sustrato y enzima.

1.2.- Así mismo, es importante evaluar el uso de diferentes cofactores que pudieran interactuar en el sitio activo de la proteína por ende, evaluar su capacidad para actuar bajo diferentes sustratos y producir diferentes beta u omega aminoácidos. Dada la diversidad de este tipo de enzimas, ya que se ha reportado su capacidad para producir diferentes beta u omega aminoácidos.

2.- Llevar a cabo mutaciones en la cepa de *A. fabrum* C58 en los genes *dpD* y *gabT* sobre el fondo genético de la mutante *panD/amaB*; con la finalidad de observar si la cepa muestra fenotipo de auxotrofia de  $\beta$ -alanina.

3.- Realizar una mutante doble por el método de datsenko en el fondo genómico de *E. coli* K12 MG1655 *panD*, sobre el gen *amaB* con la finalidad de evaluar la

capacidad de restablecer el crecimiento en esta mutante al complementarla con el gen *amaB* de *R. etli* CFN42.

3.1.- Complementar la mutante *panD* de *E. coli* K12 MG1655 con el gen *dpD* de *Rhizobium etli* CFN42; evaluando así la capacidad de esta mutante de producir beta alanina mediante la vía de degradación de uracilo. Dado que *E. coli* no tiene este gen y por lo tanto, la mutante en *panD* se vuelve auxótrofa de beta alanina.

## Anexos

### Anexo 1 Complementación genética.

Una vez que obtuvimos los genes candidatos, se mutaron en los diferentes organismos modelo: *R. etli* CFN42, *Rhizobium tropici* CIAT 899, *Agrobacterium fabrum* C58.

Tabla 1.- genes mutados pertenecientes a las diferentes vías metabólicas.

ORGANISMO	GEN					
	descarboxilasa	Transaminasas		Descarboxilasa	Vía de degradación de uracilo	Glutaminasa
	ADC	AaM	GabT	GAD	AmaB	glsA
<i>Rhizobium etli</i> CFN42		x	x	x	✓	x
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899		x	x			
<i>Agrobacterium fabrum</i> C58	x	x			x	

Del resultado de estas mutantes seleccionamos el gen *amaB* (RHE\_CH03290), ya que fue el único en presentar fenotipo de auxotrofia.

Posteriormente se sometió a la cepa mutante en *amaB* a diferentes complementaciones químicas, esto con la finalidad de demostrar que la carencia de esta cepa esta dada solo por beta alanina y a su vez, pantotenato.

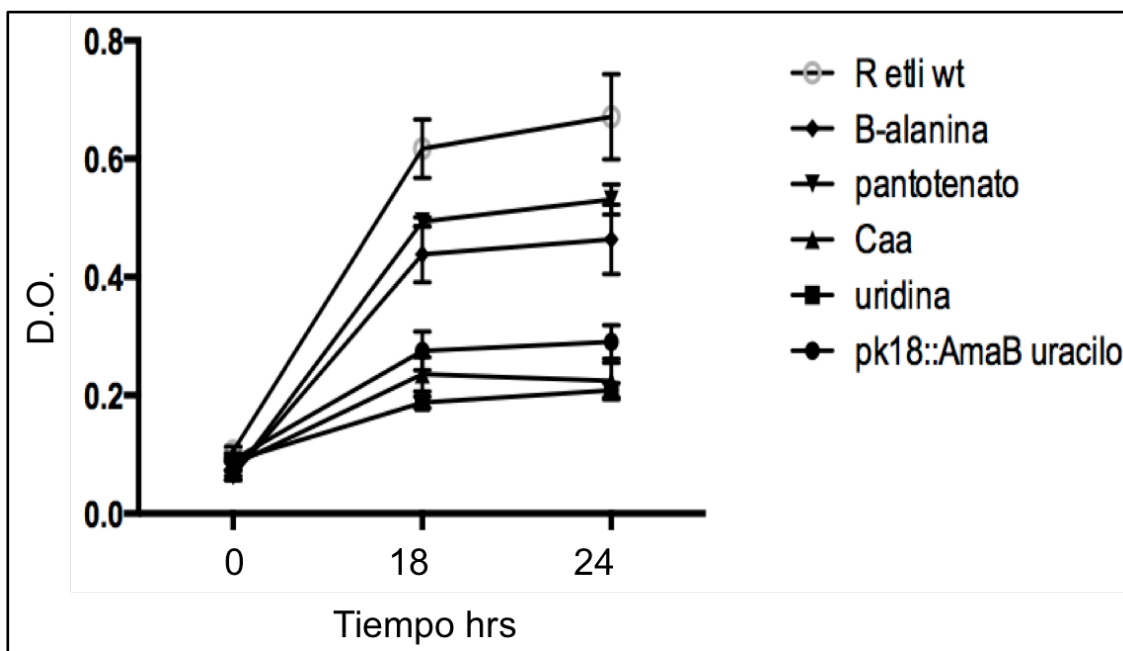


Fig.- 1 Cinéticas de crecimiento de la cepa silvestre y la mutante. (Caa) casaminoácidos.

Siguiendo con la parte genética se realizaron complementaciones de la mutante pK18::AmaB, con diferentes genes de otras vías alternas, de este modo podríamos encontrar enzimas secundarias que pudieran estar produciendo beta alanina en *Rhizobium*. De esta observaríamos si puede haber redundancia funcional en este rhizobio.

Tabla 2.- Genes complementados en la mutante en *R. etli* pK18::AmaB.

Organismo	Complementación en <i>R. etli</i> PK18:amaB				
	Descarboxilasa	Transaminasa	Descarboxilasa	$\beta$ -alanina sintasa	Glutaminasa
	panD	EC. 2.6.1.18		AmaB	GlsA
<i>Rhizobium etli</i> CFN42		x	x	✓	x
<i>Agrobacterium fabrum</i> C58	x	x		✓	
<i>E. coli</i> K12	✓				

## Anexo 2 complementación química

Se realizaron estudios de TLC con extractos crudos de la cepa silvestre de *R. etli* CFN42, en los cuales se utilizo el sustrato ác. 3Ureidopropionico,  $MnCl_2$ , buffer tris 100 mM pH8 y extracto crudo. Para este ensayo también utilizamos extractos crudos de una cepa de *E. coli*  $\Delta$ panD con el vector pUC19::AmaB.



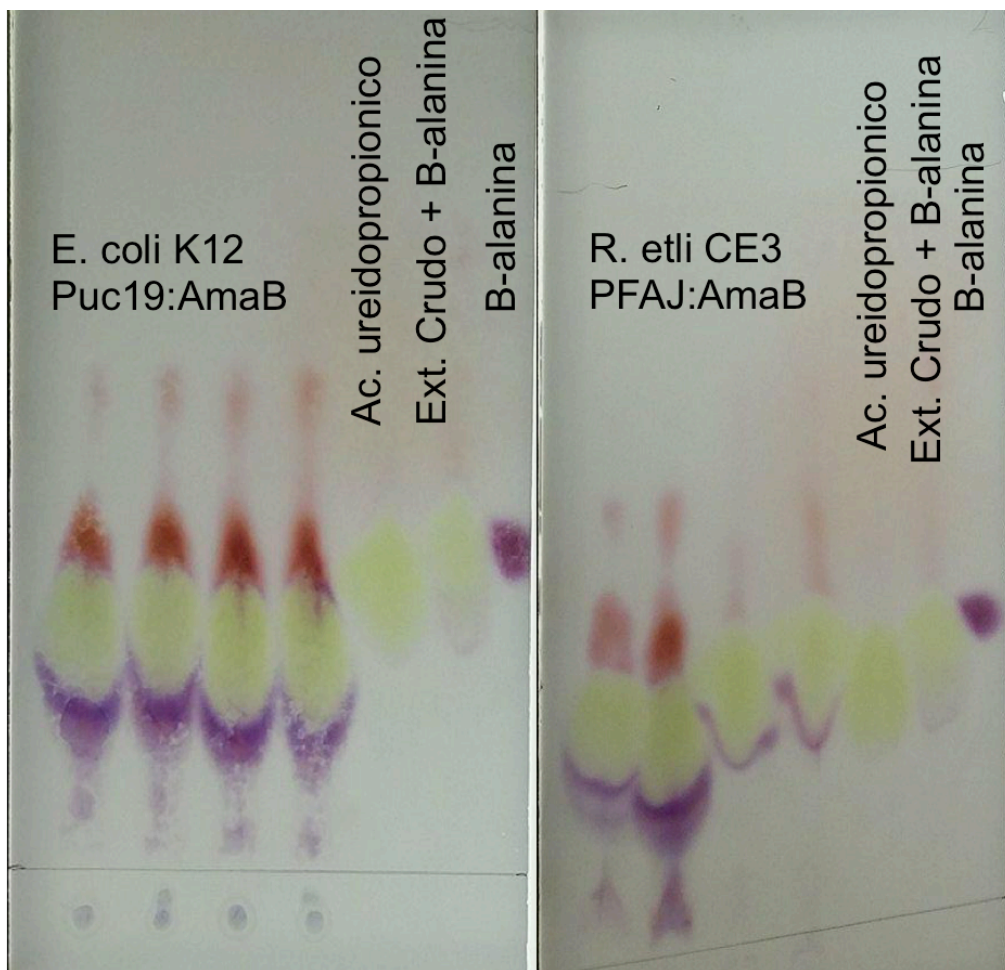


Fig.- 3 Panel a) extractos crudos de la expresión de AmaB en el fondo genómico de *E. coli*  $\Delta$ panD. Panel b) extractos crudos de la cepa de *R. etli* CFN42 y de *R. etli* CFN42 pFAJ1708::Amab.

## BIBLIOGRAFIA

- Brom, S., Garcia-De-los-Santos, A., Stepkowsky, T., Flores, M., Davila, G., Romero, D., & Palacios, R. (1992). Different plasmids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* are required for optimal symbiotic performance. *Journal of Bacteriology*, 174(16), 5183–5189.  
<https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5183-5189.1992>
- Cronan, J. E., Littel, K. J., & Jackowski, S. (1982). Genetic and biochemical

- analysis of pantothenate biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*.
- Cronan Jr, J. E. (1980). Beta-alanine synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 141(3), 1291–1297. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/141/3/1291.short>
- Dalluge, J. J., Liao, H., Gokarn, R., & Jessen, H. (2005). Discovery of enzymatic activity using stable isotope metabolite labeling and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(20), 6737–6740. <https://doi.org/10.1021/ac051109y>
- Duhazé, C., Gagneul, D., Leport, L., Larher, F. R., & Bouchereau, A. (2003). Uracil as one of the multiple sources of  $\beta$ -alanine in *Limonium latifolium*, a halotolerant  $\beta$ -alanine betaine accumulating Plumbaginaceae. *Plant Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.06.002>
- Gerdes, S. Y., Scholle, M. D., D'Souza, M., Bernal, A., Baev, M. V, Farrell, M., ... Osterman, A. L. (2002). From genetic footprinting to antimicrobial drug targets: examples in cofactor biosynthetic pathways. *Journal of Bacteriology*.
- Gonzalez, V., Janga, S. C., Moreno-Hagelsieb, G., Jimenez-Jacinto, V., Bustos, P., Santamaria, R. I., ... Ramirez, M. A. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(10), 3834–3839. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508502103>
- Henley, J. M. (n.d.). Amino Acid Neurotransmitters.
- Herrmann, G., Seimer, T., Jessen, H. J., Gokarn, R. R., Selifonova, O., Gort, S. J., & Buckel, W. (2005). Two beta-alanyl-CoA:ammonia lyases in *Clostridium propionicum*. *FEBS Journal*, 272(3), 813–821. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04518.x>
- Katahira, R., & Ashihara, H. (2006). Dual function of pyrimidine metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) plants: Pyrimidine salvage and supply of  $\beta$ -alanine to pantothenic acid synthesis. *Physiologia Plantarum*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00658.x>
- Leonardi, R. and, & Jackowski, S. (2007). Biosynthesis of pantothenic acid and

- coenzyme A. *EcoSal Plus*, 2(2), 1–20. <https://doi.org/10.1128/ecosal.3.6.3.4>.
- Leonardi, R., Zhang, Y. M., Rock, C. O., & Jackowski, S. (2005). Coenzyme A: Back in action. *Progress in Lipid Research*, 44(2–3), 125–153. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.04.001>
- Liepmann, A. H., & Olsen, L. J. (2001). Peroxisomal alanine: Glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00961.x>
- Lundgren, S., Gojković, Z., Piškur, J., & Dobritsch, D. (2003). Yeast  $\beta$ -Alanine Synthase Shares A Structural Scaffold and Origin with Zinc-dependent Exopeptidases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51851–51862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308674200>
- Margolin, W. (2014). Differentiation of Free-Living Rhizobia into Endosymbiotic Bacteroids. *Prokaryotic Development*, 441–466. <https://doi.org/10.1128/9781555818166.ch22>
- Martínez-Rodríguez, S., Martínez-Gómez, A. I., Rodríguez-Vico, F., Clemente-Jiménez, J. M., & Las Heras-Vázquez, F. J. (2010). Carbamoylases: Characteristics and applications in biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2250-y>
- Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of Rhizobium-Phaseolus vulgaris symbiosis: Overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252(1), 11–23. <https://doi.org/10.1023/A:1024199013926>
- Miller, C. N., LoVullo, E. D., Kijek, T. M., Fuller, J. R., Brunton, J. C., Steele, S. P., ... Kawula, T. H. (2013). PanG, a new ketopantoate reductase involved in pantothenate synthesis. *Journal of Bacteriology*, 195(5), 965–976. <https://doi.org/10.1128/JB.01740-12>
- Monteiro, D. C. F., Patel, V., Bartlett, C. P., Nozaki, S., Grant, T. D., Gowdy, J. A., ... Webb, M. E. (2015). The structure of the PanD/PanZ protein complex reveals negative feedback regulation of pantothenate biosynthesis by coenzyme a. *Chemistry and Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.03.017>

- Nanaya, T., Hidenori, O., Keiko, K., tatsuhiko, Ikeda, A., & Takao, H. (1982). Purification and Properties of B-alanine Aminotransferase from Rabbit Liver. *Biochem, J*, 92(4), 1009–1017.
- Oldroyd, G. E. D., & Downie, J. A. (2008). Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annual Review of Plant Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839>
- Ottenhof, H. H., Ashurst, J. L., Whitney, H. M., Saldanha, S. A., Schmitzberger, F., Gweon, H. S., ... Smith, A. G. (2004). Organisation of the pantothenate (vitamin B5) biosynthesis pathway in higher plants. *Plant Journal*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01940.x>
- Plesofsky-Vig, N., & Brambl, R. (2003). Pantothenic Acid and Coenzyme a in Cellular Modification of Proteins. *Annual Review of Nutrition*. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.08.070188.002333>
- Primerano, D. A., & Burns, R. O. (1983). Role of acetohydroxy acid isomeroreductase in biosynthesis of pantothenic acid in Salmonella typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 259–269. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6401279>
- Ramjee, M. K., Genschel, U., Abell, C., & Smith, A. G. (1997). Observation of Reaction Intermediates By Electrospray Mass Spectrometry. *Biochemistry*, 323, 661–669.
- Schnackerz, K. D., & Dobritsch, D. (2008). Amidohydrolases of the reductive pyrimidine catabolic pathway. Purification, characterization, structure, reaction mechanisms and enzyme deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.01.005>
- Spry, C., Kirk, K., & Saliba, K. J. (2008). Coenzyme A biosynthesis: An antimicrobial drug target. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(1), 56–106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00093.x>
- Stolz, J., Caspari, T., Carr, A. M., & Sauer, N. (2004). Cell Division Defects of Schizosaccharomyces pombe liz1 – Mutants Are Caused by Defects in Pantothenate Uptake. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 406–412. <https://doi.org/10.1128/ec.3.2.406-412.2004>

- Stolz, J., & Sauer, N. (1999). The fenpropimorph resistance gene FEN2 from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a plasma membrane H<sup>+</sup>-pantothenate symporter. *Journal of Biological Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18747>
- Tomita, H., Yokooji, Y., Ishibashi, T., Imanaka, T., & Atomia, H. (2014). An archaeal glutamate decarboxylase homolog functions as an aspartate decarboxylase and is involved in  $\beta$ -Alanine and coenzyme a biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 196(6), 1222–1230. <https://doi.org/10.1128/JB.01327-13>
- Wang, Y., Xu, H., & White, R. H. (2014).  $\beta$ -alanine biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii*. *Journal of Bacteriology*, 196(15), 2869–2875.  
<https://doi.org/10.1128/JB.01784-14>
- Weir, B. S. (2011). The current taxonomy of rhizobia. *New Zealand Rhizobia Website*.
- White, W. H., Gunyuzlu, P. L., & Toyn, J. H. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Is Capable of de Novo Pantothenic Acid Biosynthesis Involving a Novel Pathway of  $\beta$ -Alanine Production from Spermine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10794–10800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009804200>
- Wilding, M., Peat, T. S., Newman, J., & Scott, C. (2016). A  $\beta$ -Alanine Catabolism Pathway Containing a Highly Promiscuous  $\omega$ -Transaminase in the 12-Aminododecanate-Degrading *Pseudomonas* sp. Strain AAC. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3846–3856.  
<https://doi.org/10.1128/aem.00665-16>
- Williamson, J. M., & Brown, G. M. (1979). Purification and properties of L-aspartate- $\alpha$ -decarboxylase, an enzyme that catalyzes the formation of  $\alpha$ -alanine in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*.
- Yun, H., Lim, S., Cho, B., & Kim, B. (2004). B-Amino Acid:Pyruvate Transaminase from *Microbiology*, 70(4), 2529–2534. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2529>